



# Tumorigenèse, progression tumorale et zonation fonctionnelle du cortex surrénalien

Coralie Drelon

## ► To cite this version:

Coralie Drelon. Tumorigenèse, progression tumorale et zonation fonctionnelle du cortex surrénalien. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22536 . tel-01226928v2

**HAL Id: tel-01226928**

**<https://theses.hal.science/tel-01226928v2>**

Submitted on 27 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,  
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**  
N° d'ordre : 657

**Thèse**

Présentée à l'Université Blaise PASCAL  
Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire  
(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement par

**Coralie DRELON**

Le 19 décembre 2014

---

**Tumorigenèse, progression tumorale et zonation fonctionnelle du  
cortex surrénalien.**

---

Président :

Dr Philippe ARNAUD, UMR GReD, Clermont-Ferrand

Rapporteurs :

Dr Christine PERRET, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris  
Pr Gérald RAVEROT, Hospices Civils de Lyon - Université Lyon 1, Lyon

Examineur :

Dr Bruno RAGAZZON, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris

Directeur de thèse :

Dr Pierre VAL, UMR GReD, Clermont-Ferrand





**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,  
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**  
N° d'ordre : 657

**Thèse**

Présentée à l'Université Blaise PASCAL  
Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire  
(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement par

**Coralie DRELON**

Le 19 décembre 2014

---

**Tumorigenèse, progression tumorale et zonation fonctionnelle du  
cortex surrénalien.**

---

Président :

Dr Philippe ARNAUD, UMR GReD, Clermont-Ferrand

Rapporteurs :

Dr Christine PERRET, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris  
Pr Gérard RAVEROT, Hospices Civils de Lyon - Université Lyon 1, Lyon

Examineur :

Dr Bruno RAGAZZON, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris

Directeur de thèse :

Dr Pierre VAL, UMR GReD, Clermont-Ferrand



# Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury de thèse : le Docteur Christine Perret, le Professeur Gérald Raverot, le Docteur Bruno Ragazzon et le Docteur Philippe Arnaud d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « AKR » présents et passés : Pierre, Antoine, Marie, Jean-Christophe, Isa, Fanny, Annabel, Cameron, Emilie, Igor, Typhanie, Mike, Houdda, Nathanaëlle pour leur accueil, leur aide et leurs conseils tout à long de ces 4 années. Merci pour tous les bons moments partagés.

Je tiens à remercier particulièrement Pierre. Merci de m'avoir fait confiance pour mener ce travail de thèse. Je te remercie d'y avoir toujours cru, ou en tout cas de me l'avoir fait croire. Merci de n'avoir jamais abandonné, d'avoir toujours su trouver des solutions lorsque les projets n'avançaient pas comme prévu. Je te remercie de ton implication et de ton investissement pour ma thèse et pour l'après thèse.

Je remercie Antoine pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour tous tes conseils au cours de ces 4 années. Merci également d'avoir rempli mon 1 r constat d'accident...

Je remercie Marie à qui je dois un peu mes débuts dans cette équipe... Merci pour les conseils scientifiques et de lecture.

Merci   Jean-Christophe pour ton aide au cours de ces 4 années. Et merci de ne pas nous avoir laissé nous déshydrater au cours des différents pots de thèse, repas de noël et autres...

Merci   Isabelle pour toutes les choses que tu m'as apprises à la paillasse, je garderai toujours un excellent souvenir du dosage cortico...

Mike je te remercie de prendre la suite et de le faire bien. Je te remercie de ne pas m'avoir tenu rigueur de mon accueil un peu froid à ton arrivée. Merci pour la Team Val, merci pour la boisson dont j'ai encore oublié le nom. Je te souhaite la meilleur des thèses sur le meilleur des bureaux.

Typhanie, j'ai été contente de partager cette dernière année avec toi. Merci pour ta disponibilité, ton aide et d'être berrichonne... J'espère que tous tes projets t'apporteront la réussite que tu mérites.

Cameron, merci pour ton aide et tes conseils. Je te remercie de m'avoir c d  quelques AdTag, même si le génotypage n'a pas été une partie de plaisir. Je te souhaite une très bonne fin de thèse.

Houdda, la dernière recrue de la Team Val. Bienvenue ! Je te souhaite une très belle thèse.

Emilie, merci pour tes visites dans le bureau, pour avoir répondu à toutes mes questions sur le maniement de Word. Je te remercie aussi pour ces nouveaux « quart d'heure chômage », qui j'espère se termineront bientôt pour être remplacés par des « quart d'heure nouveau boulot ».

Merci   Annabel de m'avoir ouvert la voie. Merci pour ton aide à mon arrivée et tes conseils à la fin. J'espère que ton post-doc t'apportera toute satisfaction.

Fanny, merci pour ton accueil à mon arrivée et à Toulouse. Je te remercie de m'avoir légué ton bureau (le meilleur des bureaux). Merci pour tes conseils pendant le début de mon master 2 et pour ceux qui ont suivi aussi. J'étais très heureuse de pouvoir profiter de ma soirée de thèse en ta compagnie. J'espère que tes nouveaux projets t'apporteront tout ce que tu souhaites.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire pour leur aide et leurs conseils.



Silvère, merci d'avoir toujours pris le temps de nous aider pour les xénogreffes et autres. Je te remercie pour ta disponibilité et pour l'intérêt que tu as porté à ma thèse.

Jean-Marc, merci pour toutes tes conversations téléphoniques qui m'ont évité l'endormissement au bureau (ou la concentration ?). Je te remercie aussi pour l'aide que tu as pu m'apporter durant ces années de thèse.

Françoise, merci d'avoir été là tout au long de ma thèse et de ne pas avoir révélé notre oubli...

Merci à mes collègues de bureau Jean-Jo, Manue, Salwann. Jean-Jo, merci d'avoir pris soin de nos mains (merci aussi au Petit Marseillais) et pour les bons moments au labo et en dehors. Manue je te laisse en chef (ou veille) du bureau. Ce fut un plaisir de partager ces quelques mètres carrés avec toi, merci pour ton écoute, d'avoir vérifié certains de mes calculs... Je te souhaite une 4<sup>ème</sup> année de thèse. Salwann, je te remercie pour tes conseils, notamment lors de la rédaction. Merci aussi de m'avoir fait rire. J'espère que ta thèse se finira vite et bien.

Lauriane (Laurianne ?) et Betty (Penny ?) j'ai été contente de partager ces derniers mois avec vous. Merci d'avoir pris le temps d'écouter mes petits problèmes de rédaction et plein d'autres choses. Lauriane, j'espère que ton post-doc se passera comme tu le souhaites. Betty je te souhaite de réaliser tous tes projets, les anciens comme les nouveaux.

Merci à Angélique pour m'avoir coaché pour la Midiprep et d'avoir toujours eu une oreille attentive pour écouter mes petits tracas de génotypage et autres. Merci à Jean-Paul pour l'aide et les conseils en Western Blot.

Je remercie également Christelle pour toute l'aide apportée en histo.

Je voudrais également remercier Fabrice et Ayhan pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'aider.

Je remercie Khirredine, Sandrine et Philippe pour toute l'aide apportée à l'animalerie.

Merci aussi aux étudiants et post-doc passés.

Merci à Hugues, j'ai été très contente de partager une paillasse avec toi, malgré ta mauvaise habitude de prendre des cônes n'importe où dans ma boîte.

Emilie et Julie, merci, vous avez été les premières à m'accueillir dans ce labo et surtout dans le bureau des étudiantes. Emilie se fut un plaisir d'apprendre l'extraction d'ARN au trizol sous ta direction. Merci d'avoir pris le temps pour moi, merci pour ta gentillesse à mes débuts. Julie, je te remercie pour ton écoute, tous tes conseils, mon bureau annexe, mon surnom...

Aurélije je voudrais te remercier pour ton écoute sans jugement, pour toutes les pâtisseries qui ont un peu adouci la fin de la rédaction.

Merci également aux étudiants Biomov passés et présents. Mathias, je vais regretter ta maîtrise du barbecue, merci pour tes conseils de « vieux thésard ». Profite bien de Cambridge et de tous ses pubs. Axel, merci d'avoir été là dans les moments les moins faciles. Je te souhaite de très bons moments à Oxford. Margot, ce fut un plaisir de partager des pauses clopes. J'espère que ta thèse se poursuivra comme tu le souhaites.

Je remercie les « collègues de psycho » : Gérard, Sophie, Laëtitia, Catherine et Marc. Merci à vous pour les bons partagés en TP.

Ludo, j'ai été heureuse de te rencontrer. Merci pour ta bonne humeur constante, merci d'avoir été là ce jour là et les autres jours.



Kévin, merci d'être venu renforcer notre petit groupe. Je te remercie d'être toujours disponible pour écouter. Merci aussi à Géraldine qui comprend mon désarroi face à vos blagues. Votre PACS fut un bon et beau moment de décompression en pleine rédaction. Merci. Je te souhaite du courage pour la fin et que l'après thèse t'apporte tout ce que tu souhaites.

Je remercie ceux qui ont été là dès le début. Sans vous je n'y serais peut-être pas arrivé. Merci d'avoir été là chaque jour pour m'apporter un peu de légèreté et beaucoup de bonne humeur.

Marion, tu es une des premières personnes qui m'a accueillie à Clermont, merci. Je te remercie de nous avoir fait découvrir Strasbourg. Merci d'avoir été là malgré la distance, d'avoir écouté les petits problèmes malgré tes gros problèmes. Merci d'avoir donné de ta personne pour les anniversaires et les thèses. Je te souhaite une fin de thèse rapide et sans douleur. J'espère que tu poursuivras malgré tout et que tu pourras enfin d'épanouir dans le boulot.

Heïdi, infiniment merci. Merci d'avoir été présente (physiquement) pendant les trois premières années et d'avoir été là (« skype ») ces derniers mois. Je te remercie pour tes encouragements tout au long de cette aventure et après. Merci d'avoir pris le temps (et l'argent) pour assister à ma thèse, sans toi ça n'aurait pas été pareil. J'espère que Cambridge t'apportera tout ce que tu souhaites.

Rafik, je te dois beaucoup de merci... Merci d'avoir été là tout au long de ma thèse. Je te remercie d'avoir toujours pris le temps d'écouter mes petits problèmes et pour tes conseils. Je te dois mon apprentissage de la dislocation. Mais je regrette que tu n'ais pas réussi à m'enseigner le rythme... Je te souhaite beaucoup de patience et de philosophie pour cette fin de thèse. J'espère que tu trouveras malgré tout l'envie et la possibilité de poursuivre, je n'aime pas le gâchis.

Marine, tu vas partir d'ici 2 mois... Comment je vais faire moi ? A toi aussi je dois beaucoup de merci. Je te remercie d'avoir été présente à Edinburgh et de m'avoir soutenue. Merci pour ta présence quotidienne, pour toute l'aide que tu m'as apportée. Tu vas terriblement me manquer, mais j'espère que tu resteras « skype » présente... J'espère que tu réaliseras tout ce que tu souhaites dans cette nouvelle vie qui t'attend. Profitez bien de cette nouvelle aventure.

Pauline, malgré tout je dois aussi te remercier. Tu m'as aidé à grandir.

Je tiens également à remercier la famille de Mickaël pour leur présence et leur soutien tout au long de ces nombreuses années.

Je remercie mes parents pour tout. Merci de m'avoir tant encouragée et soutenue.

Mickaël, je crois que tu sais déjà tout. Merci d'avoir été là avant, pendant et après. Sans toi, rien de tout ça n'aurait eu lieu.





Ce travail de thèse a été réalisé dans l'équipe « Tumeurs surrenaliennes et homéostasie du tissu adipeux blanc » au sein du laboratoire Génétique Reproduction et Développement (GReD) de Clermont-Ferrand, une unité mixte de recherche CNRS 6293, INSERM U1103 et Clermont Université.

## Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles publiés ou en cours de publication :

**Drelon C**, Berthon A, Ragazzon B, Tissier F, Bandiera R, Sahut-Barnola I, de Jousineau C, Batisse-Lignier M, Lefrançois-Martiner A.M, Martinez A, Val P.

*Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models.*

Plos One. 2012 7(8):e44171. **(Article 1)**

**Drelon C**, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Batisse-Lignier M, Tauveron I, Lefrançois-Martinez AM, Pointud JC, Vainio S, Schedl A, Stratakis C, Martinez A, Val P.

*WNT signalling inhibition by PKA is involved in adrenal zonation and prevents tumour development.*

En préparation. **(Article 2)**

## Les articles suivants sont présentés en annexe :

**Drelon C**, Berthon A, Val P.

*Adrenocortical Cancer and IGF2: Is the Game Over or our Experimental Models Limited?*

J Clin Endocrinol Metab, February 2013, 98(2):505–507. **(Article 3)**

Berthon A, **Drelon C**, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, Plateroti M, Lefebvre H, Sahut-Barnola I, Batisse-Lignier M, Assié G, Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, Val P.

*WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosterone producing adenomas and controls aldosterone production.*

Hum Mol Genet, 2014 Feb 15;23(4):889-905. **(Article 4)**

De Jousineau C, Sahut-Barnola I, Tissier F, Dumontet T, **Drelon C**, Batisse-Lignier M, Tauveron I, Pointud JC, Lefrançois-Martinez AM, Stratakis CA, Bertherat J, Val P, Martinez A.

*mTOR pathway is activated by PKA in adrenocortical cells and participates in vivo to apoptosis resistance in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD).*

Hum Mol Genet. 2014 Oct 15;23(20):5418-28. **(Article 5)**



Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :

Communications orales à des congrès ou conférence avec comité de lecture :

**Réseau Comete**, Paris, Décembre 2013.

Identification of EZH2 as a new actor of malignant progression in adrenal cortex carcinoma.

**29<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Endocrinologie**, Toulouse, Octobre 2012.

Analyse du rôle de Igf2 dans le développement tumorale surrénalien dans un modèle de souris transgénique.

**Réseau Comete**, Paris, Décembre 2011.

Interaction of Wnt/ $\beta$ -catenin and Igf2 signalling pathways in adrenocortical tumorigenesis.

**Journée de l'IFR 79, santé Auvergne**, Clermont-Ferrand, Décembre 2011.

Intéraction des signalisations Wnt/  $\beta$ -catenin dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne.

**Réseau Carney**, Paris, Novembre 2011.

Interaction of Wnt/ $\beta$ -catenin and Igf2 signalling pathways in adrenocortical tumorigenesis.

Communications affichées :

**XVI International Conference on the Adrenal Cortex**, Chicago, Juin 2014.

Identification of EZH2 as a new actor of malignant progression in adrenal cortex carcinoma.

**12th ENS@T meeting**, Budapest, Novembre 2013.

Identification of EZH2 as a new actor of malignant progression in adrenal cortex carcinoma.

**30<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Endocrinologie**, Paris, Octobre 2013.

Identification of EZH2 as a new actor of malignant progression in adrenal cortex carcinoma.



# RESUME



Les carcinomes cortico-surrénaux (CCS) sont des tumeurs malignes rares de mauvais pronostic et pour lesquelles les options thérapeutiques efficaces sont inexistantes. Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des CCS, afin d'améliorer leur prise en charge. Les deux altérations les plus fréquentes dans les CCS sont une surexpression du facteur de croissance IGF2 et l'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Le laboratoire a mis en évidence le rôle oncogénique de la  $\beta$ -caténine à l'aide d'un modèle murin (souris  $\Delta$ Cat) présentant une activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale. Toutefois, la faible pénétrance du phénotype malin suggère la nécessité d'autres altérations pour la progression tumorale. L'objectif initial de ma thèse était de tester le pouvoir oncogénique de IGF2, seul ou en association avec l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine. Les modèles de surexpression de IGF2 dans la cortico-surrénale nous ont permis de montrer que IGF2 n'initie pas le développement de tumeurs cortico-surrénales. Dans un contexte d'activation de la  $\beta$ -caténine, la surexpression de IGF2 favorise le développement tumoral à des stades tardifs. Toutefois la formation de tumeurs malignes reste un événement rare. Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de IGF2 et l'activation de la  $\beta$ -caténine ne sont pas suffisantes dans notre modèle pour induire le développement de CCS. Une analyse rétrospective des données de transcriptome nous a permis de mettre en évidence une surexpression de l'oncogène putatif et histone méthyl-transférase EZH2, qui est associée à un mauvais pronostic. Mes travaux *in vitro* suggèrent que EZH2 est surexprimé en réponse à une surexpression des facteurs E2F et qu'il pourrait être impliqué dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose et de certaines caractéristiques tumorales des cellules cortico-surrénales humaines H295R. Des inhibiteurs pharmacologiques étant disponibles, EZH2 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des CCS.

En parallèle de ces travaux, nous avons cherché à identifier les mécanismes impliqués dans la zonation du cortex surrénalien. Au cours du renouvellement tissulaire, les cellules acquièrent d'abord une identité glomérulée puis fasciculée. L'identité de la zone glomérulée repose en partie sur l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Cette voie de signalisation induit l'expression de gènes essentiels à l'identité de cette zone et inhibe l'identité fasciculée. La différenciation fasciculée des cellules doit donc reposer en partie, sur l'inhibition de cette voie de signalisation. Nous avons donc émis l'hypothèse que la signalisation PKA, activée dans la zone fasciculée par la liaison de l'ACTH à son récepteur MC2R, s'oppose à l'activité de la  $\beta$ -caténine pour permettre la différenciation fasciculée. A l'aide d'approches pharmacologiques





et génétiques, nous avons pu mettre en évidence que l'activation de la PKA inhibe la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le cortex surrénalien et que ceci est à l'origine d'une perte de la zone glomérulée au profit d'une expansion de la fasciculée. L'effet de la PKA sur la voie Wnt résulte au moins en partie de l'inhibition de l'expression de *Wnt4* en réponse à l'activation de la PKA. En effet une diminution d'expression de *Wnt4* est observée en réponse à l'activation de la PKA dans la cortico-surrénale et l'invalidation de *Wnt4* spécifiquement dans le cortex induit un phénotype proche de celui observé lors de l'activation de la PKA. Au delà des mécanismes moléculaires de la zonation, nous avons également montré que l'effet inhibiteur de la PKA sur la signalisation Wnt était capable de s'opposer aux effets oncogéniques de la  $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale. Ces observations pourraient s'avérer pertinentes, la voie de signalisation ACTH/PKA étant inhibée dans les CCS.

Mots clés : carcinome cortico-surrénalien, voie Wnt/ $\beta$ -caténine, IGF2, EZH2, PKA, zonation du cortex surrénalien.



# ABSTRACT



Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare tumour associated with poor prognosis and for which, efficient therapeutic approaches are not available. It is therefore essential to understand the molecular mechanisms involved in ACC development in order to improve their clinical management. The two most frequent alterations in ACC are overexpression of IGF2 and constitutive activation of  $\beta$ -catenin. Our lab has previously demonstrated the oncogenic activity of  $\beta$ -catenin in the adrenal cortex by developing a mouse model of constitutive  $\beta$ -catenin activation ( $\Delta$ Cat mice). However, the low malignant progression in  $\Delta$ Cat mice suggests that other alterations are necessary for acquisition of malignancy. The initial aim of my thesis was to test the oncogenic potential of IGF2 alone or associated with constitutive  $\beta$ -catenin activation. We showed that overexpression of Igf2 in the adrenal cortex does not trigger adrenal cortex tumourigenesis. In a context of constitutive  $\beta$ -catenin activation, overexpression of Igf2 promotes tumour development at later stages. However the formation of malignant tumours remains a rare event. These data suggest that the overexpression of Igf2 and constitutive activation of  $\beta$ -catenin are not sufficient to trigger malignant tumour progression. Retrospective analysis of available ACC transcriptome data highlighted overexpression of the putative oncogene and histone methyltransferase EZH2 in ACC, which was associated with poor prognosis. My *in vitro* studies suggest that EZH2 is overexpressed in response to overexpression of E2F transcription factors and that it could be involved in control of proliferation, apoptosis and oncogenic capacities of adrenocortical carcinoma cells H295R. Interestingly, the availability of pharmacologic inhibitors suggests that EZH2 could be a novel therapeutic target for the treatment of ACC.

In parallel, we sought to identify the mechanisms involved in zonation of the adrenal cortex. During adrenal cortex renewal, cells first differentiate as glomerulosa before switching to fasciculata as they move within the cortex. Establishment of glomerulosa identity relies on the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, which induces expression of genes involved in glomerulosa differentiation and inhibits fasciculata identity. These data suggest that  $\beta$ -catenin has to be inhibited in order to allow the lineage conversion from glomerulosa to fasciculata. We thus postulated that PKA signalling pathway, which is triggered by ACTH binding to its receptor MC2R in zona fasciculata, played a role in repressing Wnt/ $\beta$ -catenin signalling to allow fasciculata differentiation. Using pharmacologic and genetic models, we have shown that PKA inhibits  $\beta$ -catenin signalling, which leads to loss of zona glomerulosa and expansion of zona fasciculata. The inhibitor effect of PKA on  $\beta$ -catenin pathway could be the result of decreased expression of *Wnt4*. Indeed, a decrease of *Wnt4* expression is observed in response



to PKA activation and inactivation of *Wnt4* in the adrenal cortex phenocopies PKA activation. We have also shown that PKA inhibits oncogenic effects of  $\beta$ -catenin in the adrenal cortex. The observation of decreased ACTH/PKA signalling in ACC suggests that this inhibition could be relevant to human adrenal tumour development.

Keywords: adrenocortical carcinoma, Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, IGF2, EZH, PKA, adrenal zonation.





# ABBREVIATIONS



3 $\beta$ HSD : 3 $\beta$ -HydroxySteroid Dehydrogenase

12-HETE : 12-hydroxyeicosatetraenoic

$\beta$ -TrCP :  $\beta$ -Transduction repeat Containing Protein)

AC : Adénylate Cyclase

ACE : Angiotensin Converting Enzyme

ACS : Adénomes Cortico-Surrénaliens

ACTH : AdrenoCorticoTrophic Hormone

Ad4BP : Adrenal 4 Binding Protein

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AIMAH : ACTH Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia

AKAP : A-Kinase Anchor Protein

AKR1B1 : Aldo Keto Reductase 1B1

Akr1b7 : Aldo Keto Reductase 1b7

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

APA : Adénome Producteur d'Aldostérone

APC : Adenomatous Polyposis Coli

Apc<sup>Min/+</sup> : Multiple intestinal neoplasia

Apc<sup>14/+</sup> : délétion de l'exon 14 de *Apc*

AR : Androgen Receptor

ARMC5 : Armadillo repeat containing 5

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

AT1R : Angiotensin II Type 1 Receptor

ATC7-L : Adrenocortical Tumor Cells 7 Left

ATP : Adénosine TriPhosphate

AVP : Arginine VasoPressine



Ca<sup>2+</sup> : calcium

CaMK : Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline dependent protein kinase

CBP : CRE Binding Protein

CCR : Cancer colorectal

CCS : Carinome Cortico-Surrénalien

CDC : Cell Division Cycle

CDK1 : Cyclin dependent kinase 1

ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation

Cited2 : CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail 2

CK1 : Casein Kinase 1

CRD : Cysteine-Rich Domain

CRE : cAMP Respond Element

CREB : cAMP respond element binding protein

CRH : Corticotropin Releasing Hormone

CRM1 : Chromosome Region Maintenance 1

CYP11A1 : Cytochrome P450 cholesterol Side Chain Clivage

CYP17 : Cytochrome P450 17 hydroxylase

CYP11B1 : Cytochrome P450 11 $\beta$  hydroxylase

CYP11B2 : Cytochrome P450 aldostérone synthase

CYP21 : Cytochrome P450 21-hydroxylase

DAG : DiAcylGlycerol

DDT : DichloroDiphenylTrichloroethane

DHEA : DeHydroEpiAndrosterone

DHEAS : DeHydroEpiAndrosterone Sulfate

Dhh : Desert hedgehog

Dkk : Dickkopf

Dll1 : Delta like homologue 1

DNMT : DNA MethylTransferase

Dvl : Dishevelled



DZNep : 3-Deazaneplanocin A

EED : Embryonic Ectoderm Development

ENSAT : European Network for the Study of Adrenal Tumours

EZH2 : Enhancer of Zest 2

ER $\alpha$  : Estrogen Receptor  $\alpha$

ERK : Extra-cellular signal Regulated protein Kinase

FAdE : Fetal Adrenal Enhancer

FGD : Familial Glucocorticoid Deficiency

FoxM1 : Forkhead box protein M1

Fz : Frizzled

GDP : Guanosine DiPhosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

GIP : Gastric inhibitory polypeptide

GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$

GTP : Guanosine TriPhosphate

H2AK119ub1 : monoubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A

H3K27me3 : triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3

HDAC : Histone DeAcetylase

HDL : High Density Lipoprotein

Hh : Hedgehog

HMG-CoA synthase : HydroxyMethylGlutaryl-Coenzyme A synthase

HMG-CoA reductase : HydroxyMethylGlutaryl-Coenzyme A reductase

HMTase : Histone MéthylTransferase

HOTS : H19 Opposite Tumor Suppressor

ICR : Imprinting Control Region

IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1

IGF-IR : Insulin-like Growth Factor I Receptor

IGF2 : Insulin-like Growth Factor 2

IGF-IIR : Insulin-like Growth Factor II Receptor





IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein

Ihh : Indian Hedgehog

IP3 : Inositol triphosphate

IRS : Insulin Receptor Substrat

JNK : Jun N-terminal Kinase

K<sup>+</sup> : Potassium

LAL : Lipase Acide Lisosomiale

LDL : Low Density Lipoprotein

LEF : Lymphoid Enhancer Factor

LH $\beta$  : Luteinizing Hormone  $\beta$

LRP5/6 : LDL-Receptor Protein 5/6

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MC2R : MelanoCortin 2 Receptor

MCM : MiniChromosome Maintenance

MDM2 : Murine Double Minute 2 oncogene

MRAP : Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

Na<sup>+</sup> : sodium

NCP : Nuclear Pore Complexes

NES : Nuclear Export Signal

NLB : Nuclei Lysis Buffer

NLS : Nuclear Localization Signal

NR5A1 : Nuclear receptor subfamily 5, groupe A, membre 1

Nups : Nucléoporines

PAF : Polypose Adenomateuse Familiale

PAG : Primordium AdrénoGonadique

PBR : Peripheral Benzodiazepine Receptor

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCP : Planar Cell Polarity



PDE : Phosphodiesterases

PFA : ParaFormAldehyde

PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2  $\alpha$

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PLC : Phospholipase C

PNMT : Phenylethanolamine N-methyltransferase

PPNAD : Primary Pigmented Nodular Adrenal Disease

POMC : Pro-OpioMélandoCortine

PP : Périportaux

PPAR $\gamma$  : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$

PRC1 : Polycomb Repressor Complex 1

PRC2 : Polycomb Repressor Complex 2

PS1 : préseniline 1

PS2 : préseniline 2

Ptch1 : Patched1

PV : Périveineux

RanBP3 : Ran-Binding Protein 3

Rb : Retinoblastome

RbAp48 : Retinoblastoma (Rb)-associated protein 48 ou RBBP7/4

R-LDL : Récepteur des LDL

RNF43 : Ring Finger 43

Rspo : R-spondin

RTqPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

SBW : Syndrome Beckwith-Wiedemann

Sf1 : Steroidogenic factor 1

SFRP : Secreted Frizzled-Related Protein

shARN : short hairpin ARN



Shh : Sonic Hedgehog

siARN : short interfering ARN

Smo : Smoothened

SR-BI : Scavenger Receptor class B type I

StAR : Steroidogenic Acute Regulatory Protein

SULT2A1 : Sulfotransferase family cytosolic 2A DHEA-preferring member 1

TCF : T-Cell Factor

TdT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

TLE : Transducin-Like Enhancer of split)

TMA : Tissue Micro Array

TSPO : Translocator Protein

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl dUTP nicken labeling

Wnt : Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family

Wt1 : Wilms tumour 1

WTX1 : Wilms Tumour gene on the X chromosome 1

ZNRF3 : Zinc and Ring Finger 3



# SOMMAIRE





SOMMAIRE .....	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
I. LES GLANDES SURRENALES .....	6
A/ La medullo-surrénale ou medulla .....	6
B/ La cortico-surrénale.....	7
II. LA STEROIDOGENESE SURRENALIENNE .....	9
A/ Entrée du cholestérol dans les cellules surrénales.....	9
1. Import du cholestérol .....	9
2. La synthèse <i>de novo</i> de cholestérol.....	10
B/ Transport intracellulaire.....	10
C/ Synthèse des stéroïdes surrénales .....	11
D/ Contrôle de la production des stéroïdes surrénales .....	12
1. Régulation de la sécrétion d'aldostérone .....	13
2. Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes .....	14
E/ Détoxification des produits secondaires de la stéroïdogenèse.....	16
III. DEVELOPPEMENT ET MAINTIEN DE LA CORTICO-SURRENALE.....	17
A/ Développement embryonnaire.....	17
1. Le primordium adreno-gonadique et l'ébauche de surrénale.....	17
2. Surrénale fœtale .....	18
3. Du cortex fœtal au cortex adulte .....	20
a/ Devenir des cellules exprimant le FAdE .....	20
b/ Implication de cellules indifférenciées : rôle de la signalisation Hedgehog.....	21
B/ Maintien et renouvellement du cortex .....	23
1. Les cellules progénitrices surrénales.....	23
2. Signalisation Hh et progéniteurs surrénales.....	24
3. Contrôle de la signalisation Hedgehog dans le cortex .....	25
4. Autres facteurs impliqués dans le recrutement des progéniteurs .....	27
5. Conclusion.....	28
D/ La zonation du cortex surrénal .....	29
1. La zone glomérulée .....	29
2. La zone fasciculée .....	30
IV. LES TUMEURS DE LA CORTICO-SURRENALE .....	32
A/ Les tumeurs bénignes .....	32
1. Adénomes cortico-surrénales .....	32
a/ Adénomes producteurs de cortisol.....	32
b/ Les adénomes producteurs d'aldostérone.....	34
2. Les hyperplasies cortico-surrénales.....	35
a/ Les hyperplasies micronodulaires pigmentées .....	35
b/ Hyperplasies macronodulaires bilatérales.....	36
B/ Les carcinomes cortico-surrénales .....	38
1. Diagnostic .....	39



2.	Traitements.....	39
3.	Les altérations retrouvées dans les carcinomes cortico-surrénaux.....	40
a/	Perte de p53.....	41
b/	Surexpression de IGF2.....	41
V.	LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/ $\beta$ -CATENINE.....	45
A/	Description de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine .....	46
1.	En absence de ligand Wnt.....	46
2.	Activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.....	47
a/	Les ligands Wnt et les récepteurs Frizzled et LRP.....	47
b/	Liaison du ligand aux récepteurs.....	48
c/	Import et export nucléaire de la $\beta$ -caténine.....	49
d/	Activités nucléaires de la $\beta$ -caténine.....	51
3.	Les modulateurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.....	52
a/	Les antagonistes de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.....	52
b/	Les agonistes de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.....	54
B/	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la physiopathologie .....	54
1.	Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien des progéniteurs .....	55
2.	Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la zonation hépatique .....	56
3.	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la tumorigénèse .....	56
C/	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale.....	57
1.	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les adénomes cortico-surrénaux.....	58
2.	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les carcinomes cortico-surrénaux.....	59
D/	Interactions de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine avec d'autres voies de signalisation.....	60
1.	La voie de signalisation IGF2 .....	60
2.	La voie de signalisation PKA.....	62
VI.	PRESENTATION DES PROJETS DE RECHERCHE.....	64
A/	Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et IGF2 dans la tumorigénèse cortico-surrénale.....	64
B/	Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et PKA dans la zonation cortico-surrénale.....	66
	PREMIERE PARTIE: .....	69
	Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et IGF2 dans la tumorigénèse cortico-surrénale.....	69
	RESULTATS ET DISCUSSION .....	70
	ARTICLE 1 : .....	71
	PERSPECTIVES .....	91
	DEUXIEME PARTIE : .....	98
	Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et PKA dans la zonation cortico-surrénale.....	98
	RESULTATS ET DISCUSSION .....	99
	ARTICLE 2 : .....	100
	PERSPECTIVES .....	101



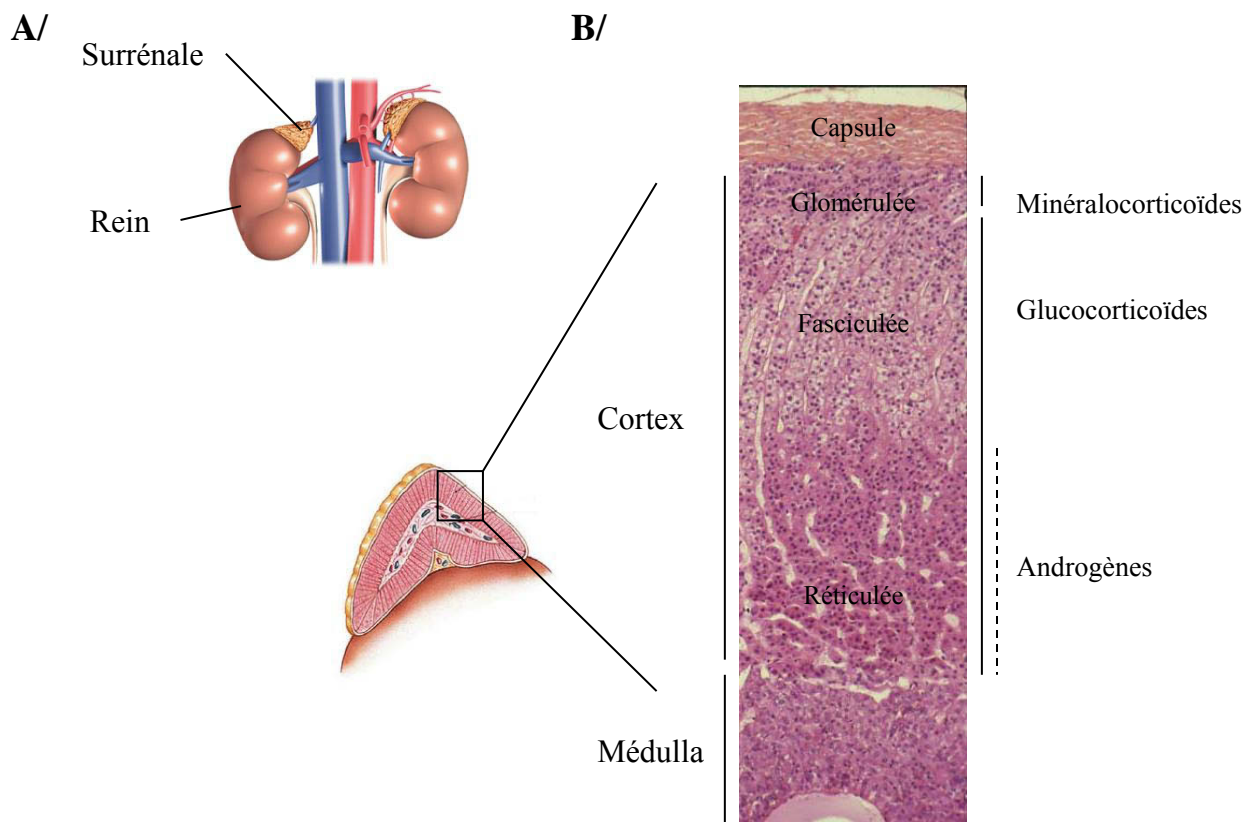
ANNEXES .....	110
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	114



# INTRODUCTION

## BIBLIOGRAPHIQUE





**Figure 1 : Représentation schématique et coupe de glande surrénale.**

**A/** Positionnement des glandes surrénales.

**B/** Coupe transversale d'une surrénale humaine. Le cortex, sous la capsule, se divise en trois zones. La zone glomérulée produit les minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone. La zone fasciculée sécrète les glucocorticoïdes comme le cortisol. La zone réticulée produit également des glucocorticoïdes et les androgènes surrénalien (DHEA et son sulfate). Au centre de la glande, la médulla produit les catécholamines.

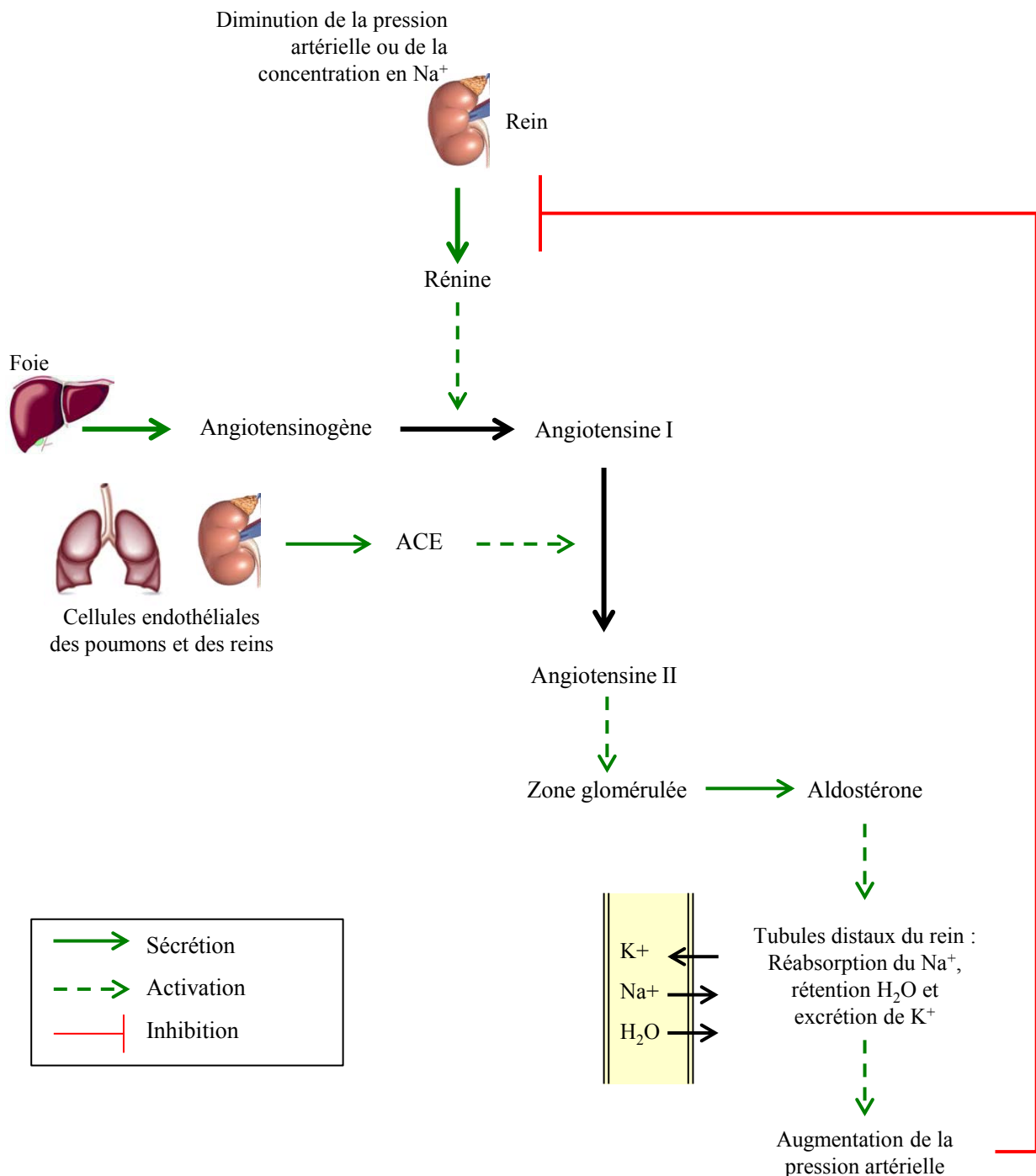
## I. LES GLANDES SURRENALES

Les surrénales sont des glandes endocrines encapsulées situées au dessus des reins (Figure 1A). Elles se composent de deux tissus d'origine embryonnaire et aux fonctions différentes : la medulla et le cortex.

### **A/ La medullo-surrénale ou medulla**

La medulla, d'origine neuro-ectodermique, se situe au centre de la glande. Les cellules chromaffines de la medulla sécrètent les catécholamines (adrénaline et noradrénaline), qui sont d'importants médiateurs de la réponse rapide au stress (de Diego et al., 2008). Ils augmentent le métabolisme du glucose (anabolisme dans le foie, catabolisme dans les muscles), le rythme cardiaque, l'activité cérébrale et induisent la lipolyse et la vasoconstriction (avec augmentation de la pression sanguine) (Jocken and Blaak, 2008; Ziegler et al., 2012).

Il existe des interactions fonctionnelles entre medulla et cortex. D'une part, les glucocorticoïdes produits par le cortex augmentent la transcription et l'activité de l'enzyme PNMT (Phenylethanolamine N-methyltransferase), responsable la conversion de la noradrénaline en adrénaline (Evinger et al., 1992; Wong et al., 1992). D'autre part, la sécrétion de glucocorticoïdes par des cellules corticales bovines est stimulée en présence de cellules chromaffines (Haidan et al., 1998). Chez la souris, dans le cas d'un stress aigu, le cortex surrénalien libère de la  $\text{PGF2}\alpha$  (Prostaglandine  $\text{F2 } \alpha$ ) qui agit au niveau des cellules chromaffines pour inhiber la sécrétion de catécholamines, entraînant une diminution de la production des glucocorticoïdes (Lambert-Langlais et al., 2009). De plus, les analyses de différents modèles murins présentant tous des défauts d'organisation corticale (agénésie, hypoplasie), ont mis en évidence l'importance des cellules cortico-surrénaliennes pour la survie des cellules chromaffines, même si la migration et la différenciation de ces cellules ne semblent pas dépendantes du cortex surrénalien (Huang et al., 2012; Kim et al., 2008a). Réciproquement, la présence de cellules chromaffines a un impact sur l'organisation corticale. En effet, dans un modèle murin dépourvu de cellules chromaffines, la cortico-surrénale se met en place, mais l'organisation en cordons est perdue (Britsch et al., 1998).



**Figure 2 : Représentation schématique du système rénine-angiotensine-aldostérone.**

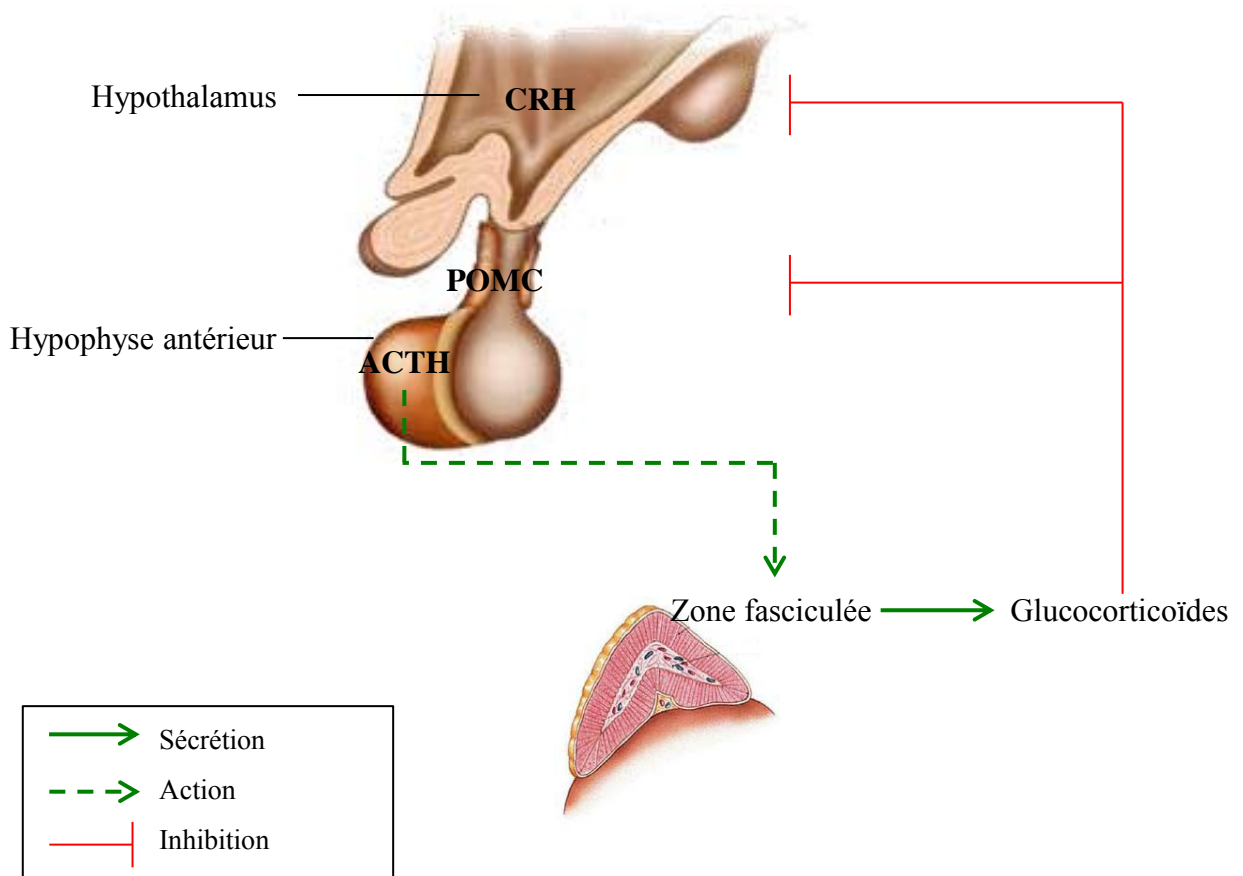
La rénine produite par l'appareil juxtaglomérulaire du rein permet le clivage de l'angiotensinogène, produit par le foie, en angiotensine I. Cette dernière est à son tour clivée par l'enzyme de conversion ACE, produite au niveau de l'épithélium pulmonaire et rénal. L'angiotensine II ainsi générée lie son récepteur à la surface des cellules de la zone glomérulée du cortex surrénalien. En réponse, ces cellules sécrètent de l'aldostérone qui agit au niveau des tubules distaux du rein pour favoriser la réabsorption de sodium, la rétention d'eau et l'élimination du potassium. Ces échanges permettent une augmentation de la volémie et donc de la pression artérielle, qui en retour agit négativement sur la libération de rénine.

## B/ La cortico-surrénale

La cortico-surrénale, d'origine mésodermique, entoure la medulla. Elle constitue 90% de la masse surrénalienne chez l'Homme (Yates et al., 2013). Le cortex surrénalien est, avec les gonades, la principale source d'hormones stéroïdiennes. Le cortex s'organise en trois zones concentriques morphologiquement et fonctionnellement distinctes (Figure 1B).

Sous la capsule, la zone glomérulée est constituée de cellules groupées en amas arrondis et représente environ 15% du cortex (Yates et al., 2013). Cette zone est responsable de la sécrétion d'aldostérone sous le contrôle du système rénine-angiotensine. Le système rénine-angiotensine-aldostérone est un important régulateur de la pression sanguine et de la balance sodium/potassium. En cas de diminution de la pression artérielle ou de la concentration en sodium, les cellules juxtaglomérulaires du rein libèrent de la rénine dans la circulation qui va cliver l'angiotensinogène (produit par le foie) en angiotensine I. L'enzyme de conversion ACE (Angiotensin Converting Enzyme), présente dans les cellules endothéliales des poumons et du rein, clive l'angiotensine I en angiotensine II. Cette dernière stimule la sécrétion d'aldostérone en se liant à son récepteur à la surface des cellules de la zone glomérulée. L'aldostérone va agir notamment au niveau des tubules distaux du rein, en favorisant la réabsorption des ions sodium et la rétention d'eau et à l'inverse l'excrétion des ions potassium (Figure 2). Ces échanges vont permettre d'augmenter la volémie et donc la pression artérielle (Tomaschitz et al., 2010).

Sous la zone glomérulée, la zone fasciculée constitue la plus large zone du cortex (> 70% du cortex) (Rosol et al., 2001). Les cellules de cette zone sont organisées en cordons dans l'axe cortex-medulla. Sous l'action de l'ACTH (AdrenoCorticoTrophic Hormone), ces cellules produisent des glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez la souris). Les glucocorticoïdes interviennent dans le métabolisme cellulaire et la réponse au stress. Ils ont un effet immuno-suppresseur et régulent le métabolisme du glucose (gluconéogenèse dans le foie, glycogénolyse dans les muscles). Ils jouent également un rôle important au cours du développement, notamment sur la maturation des poumons (Provost et al., 2013). La libération des glucocorticoïdes est régulée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. En réponse à des stimulations nerveuses, l'hypothalamus produit et libère la CRH (Corticotrophine Releasing Hormone) et l'AVP (Arginine VasoPressin), qui vont induire la synthèse et la sécrétion de l'ACTH par l'hypophyse antérieure. La CRH est le régulateur principal de l'ACTH. L'AVP n'a pas d'action seule mais potentialise l'effet de la CRH (Yates



**Figure 3 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien**

La libération de CRH par l'hypothalamus induit la production d'ACTH, après clivage du précurseur POMC, produit par l'hypophyse antérieure. L'ACTH, libérée dans le sang, va agir sur la zone fasciculée de la cortico-surrénale pour induire la production de glucocorticoïdes. En retour, les glucocorticoïdes vont agir négativement sur leur propre synthèse, en diminuant la transcription du gène *CRH* et inhibant la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse.

et al., 2013). L'ACTH est le produit du clivage de la POMC (Pro-OpioMélanoCortine). Ce clivage libère également d'autres peptides en quantités équimolaires. Ces peptides peuvent jouer un rôle dans la physiologie de la cortico-surrénale (Karpac et al., 2007). Il a notamment été décrit que le clivage de la partie amino-terminale de la POMC (acides aminés 1-74) génère un peptide (POMC1-28) possédant des propriétés mitogéniques (Estivariz et al., 1982). Les glucocorticoïdes agissent sur leur propre synthèse, en inhibant au niveau de l'hypophyse la sécrétion d'ACTH et la transcription du gène *POMC* et du récepteur à la CRH. Au niveau de l'hypothalamus, les glucocorticoïdes vont inhiber la transcription du gène *CRH* (Figure 3) (Aguilera, 2011).

La zone la plus interne de la cortico-surrénale est la zone réticulée, essentiellement retrouvée chez les primates. Elle est la source de la déhydroépiandrosterone (DHEA) et de son dérivé sulfaté (DHEAS). Ces deux androgènes surrénaliens peuvent être convertis en testostérone et 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone dans les tissus périphériques (Voutilainen and Jääskeläinen, 2014). Alors que chez l'homme, cette source d'androgène est relativement négligeable en comparaison des testicules, chez la femme la zone réticulée constitue la seule source d'androgène (Orth and Kovacs, 1998).

Les stéroïdes (aldostérone, cortisol/corticostérone et DHEA/DHEA-S) produits par ces trois zones proviennent d'un précurseur commun : le cholestérol.



## II. LA STEROIDOGENESE SURRENALIENNE

### A/ **Entrée du cholestérol dans les cellules surrénaliennes**

Les cellules cortico-surrénaliennes disposent de deux sources de cholestérol, un apport exogène ou une synthèse de novo.

#### 1. Import du cholestérol

L'apport exogène par l'alimentation ou le foie est la principale source de cholestérol des cellules surrénaliennes. Le cholestérol est transporté dans le plasma par des lipoprotéines HDL (High Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein) (Gwynne and Hess, 1980; Gwynne et al., 1984; Kovanen et al., 1980; Verschoor-Klootwyk et al., 1982). La contribution des HDL et LDL pour l'apport du cholestérol au niveau des cellules diffère selon les espèces et la nature de la stimulation hormonale.

La majorité des mammifères dont l'Homme, utilisent les LDL comme source majeure de cholestérol (Higashijima et al., 1987; Liu et al., 2000a; Martin et al., 1999). Les LDL sont captés à la membrane plasmique des cellules par le récepteur membranaire aux LDL (R-LDL). Le complexe LDL/R-LDL formé est ensuite internalisé par endocytose (Brown and Goldstein, 1986; Krieger and Herz, 1994). Le cholestérol estérifié des LDL est alors hydroxylé dans les lysosomes par la LAL (Lipase Acide Lysosomiale) et le récepteur LDL est recyclé (Brown and Goldstein, 1986; Paavola et al., 1985).

Les rongeurs, contrairement aux autres mammifères, utilisent préférentiellement les HDL pour délivrer le cholestérol au niveau cellulaire (Gwynne and Hess, 1980). Le récepteur SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) prend en charge ce cholestérol estérifié des HDL. A l'inverse du R-LDL, ce récepteur n'est pas internalisé (Acton et al., 1994). SR-BI est également capable de prendre en charge le cholestérol estérifié des LDL dans les tissus stéroïdogènes (Swarnakar et al., 1999).

L'expression de ces deux récepteurs peut être influencée par l'ACTH dans la zone fasciculée et l'angiotensine II dans la zone glomérulée. Alors que SR-BI est contrôlé à la fois par l'angiotensine II (Cherradi et al., 2001) et l'ACTH (Rigotti et al., 1996), l'effet de l'angiotensine II sur R-LDL est discutable (Capponi, 2002; Cherradi et al., 2001). En revanche, l'ACTH induit l'expression du récepteur aux LDL (Lehoux and Lefebvre, 1991).





Les hormones trophiques de la surrénale sont donc capables de réguler l'apport de cholestérol exogène afin d'augmenter les capacités de production des cellules stéroïdogènes.

## 2. La synthèse *de novo* de cholestérol

Pour répondre à une demande accrue en stéroïdes, les cellules surrénaliennes ont la capacité de synthétiser du cholestérol *de novo* à partir d'acétate. Cette synthèse nécessite les HMG-CoA (HydroxyMethylGlutaryl-Coenzyme A) synthase et HMG-CoA réductase, qui est l'enzyme limitante de la réaction. Ainsi, en cas de diminution de la concentration intracellulaire de cholestérol, l'expression de la HMG-CoA réductase est augmentée. En revanche, en présence de fortes concentrations de cholestérol, l'expression de cette enzyme est faible. Toutefois, ce rétrocontrôle négatif du cholestérol sur la HMG-CoA réductase est plutôt faible dans les surrénales, l'expression de cette enzyme étant sous le contrôle positif de l'ACTH (Rainey et al., 1986).

## **B/ Transport intracellulaire**

La première étape de la stéroïdogénèse correspond au clivage du cholestérol en prégnénolone et isocaproaldéhyde par l'enzyme CYP11A1 (P450SCC). Cette enzyme se retrouve dans la matrice mitochondriale de toutes les cellules stéroïdogènes. Le cholestérol doit donc être transporté au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.

La protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) assure le transfert du cholestérol de la membrane externe de la mitochondrie à la membrane interne. StAR a été identifiée dans les cellules de Leydig MA-10 où sa surexpression induit une augmentation de la stéroïdogénèse (Clark et al., 1994). Un modèle murin d'inactivation de StAR confirme l'implication de cette protéine dans la synthèse des stéroïdes. En effet, ces animaux subissent une mortalité périnatale causée par une déficience en glucocorticoïde et présentent une forte désorganisation de la surrénale, associée à la présence de nombreux dépôts lipidiques (Caron et al., 1997; Hasegawa et al., 2000). Ce phénotype est proche de celui des patients souffrant d'une hyperplasie congénitale lipoïde de la surrénale, causée par des mutations du gène *StAR*. L'activité de transport du cholestérol de StAR n'est possible que lorsque ce transporteur est associé à la membrane externe de la mitochondrie (Bose et al., 2002). La fusion

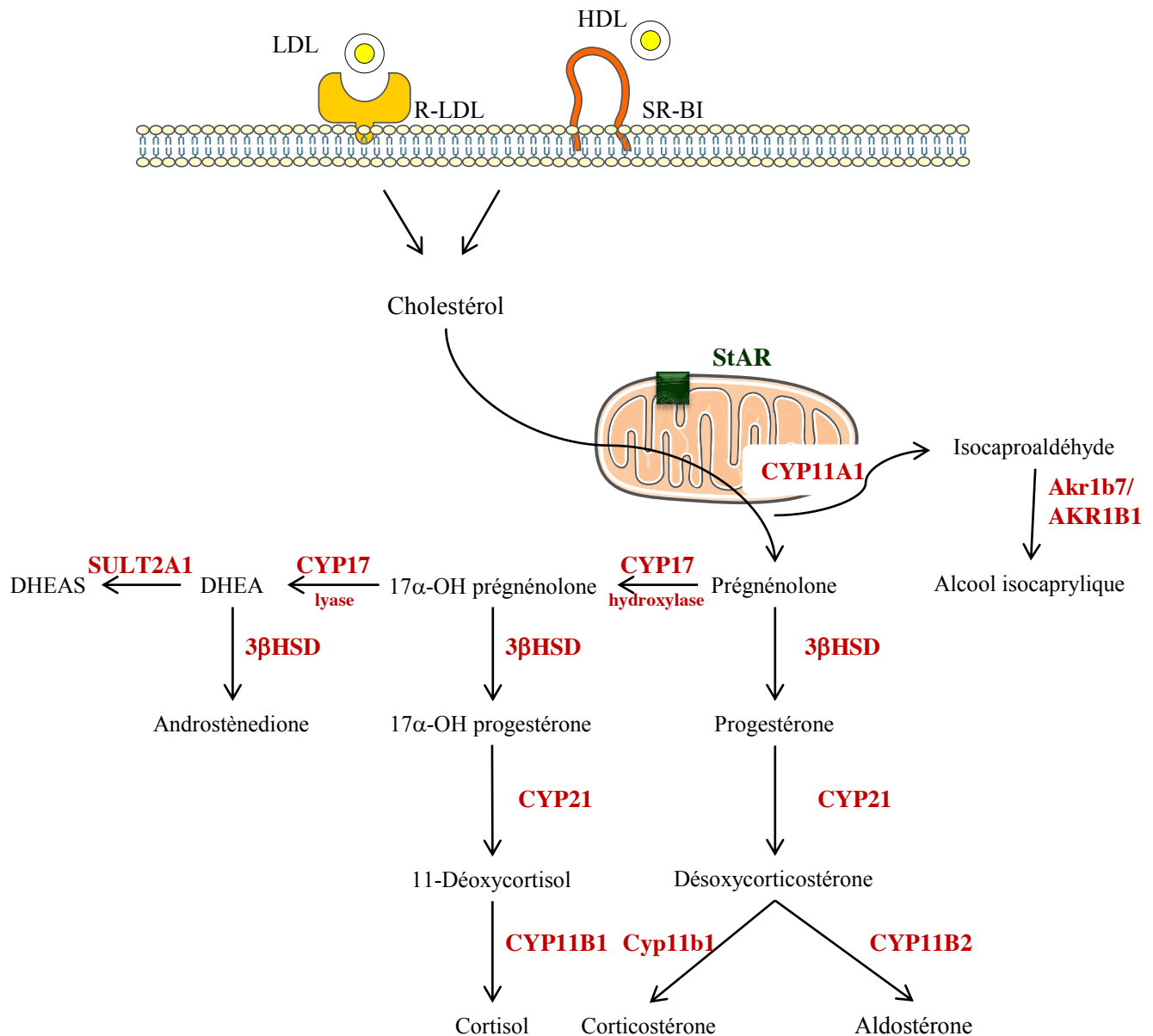


mitochondriale ainsi que les protéines ERK (Extra-cellular signal Regulated protein Kinase) pourraient être requises pour cette localisation (Duarte et al., 2014). Les hormones trophiques de la surrénale (ACTH et aldostérone) stimulent rapidement l'activité de StAR via la phosphorylation d'un résidu serine conservé entre l'Homme et la souris (serine 194 chez l'Homme et serine 195 chez la souris) (Arakane et al., 1997). La transcription de *StAR* est également régulée par ces hormones.

Une autre protéine, PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor) ou TSPO (Translocator Protein) fut longtemps considérée comme un transporteur de cholestérol à travers les membranes mitochondriales. L'implication de PBR dans la stéroïdogénèse reposait principalement sur des données *in vitro* (Kelly-Herskovitz et al., 1998; Papadopoulos et al., 1997). Le rôle de cette protéine dans la synthèse des stéroïdes n'avait pas pu être étudié *in vivo* jusqu'alors. En effet, l'invalidation de PBR dans des modèles murins aboutissait à une mortalité à des stades embryonnaires précoces, suggérant un rôle de PBR dans le développement embryonnaire (Papadopoulos et al., 1998). Récemment, un modèle d'invalidation spécifique a été développé (Morohaku et al., 2014). Les auteurs ont invalidé spécifiquement PBR dans les cellules de Leydig, afin de mieux comprendre son rôle dans la stéroïdogénèse *in vivo*. Contrairement aux observations précédentes, leurs résultats montrent que PBR ne serait pas impliqué dans la stéroïdogénèse. En effet, le développement testiculaire des souris invalidées est normal et la production de testostérone n'est pas affectée (Morohaku et al., 2014). La même équipe a pu montrer à l'aide d'un modèle murin d'invalidation totale de ce gène, que PBR n'est pas requis pour le développement embryonnaire (Tu et al., 2014). A l'aide de ce modèle, les auteurs ont pu montrer que l'absence de PBR n'affecte ni la stéroïdogénèse gonadique ni surrénalienne et aucune altération morphologique de la surrénale n'a été observée (Tu et al., 2014). Ces nouvelles données remettent donc en cause le rôle de PBR dans la stéroïdogénèse.

### **C/ Synthèse des stéroïdes surrénaliens**

Après l'étape de transport, le cholestérol doit subir plusieurs séries d'hydroxylations catalysées par les enzymes cytochrome P450 ou CYP et deux hydroxystéroïdes déshydrogénases.



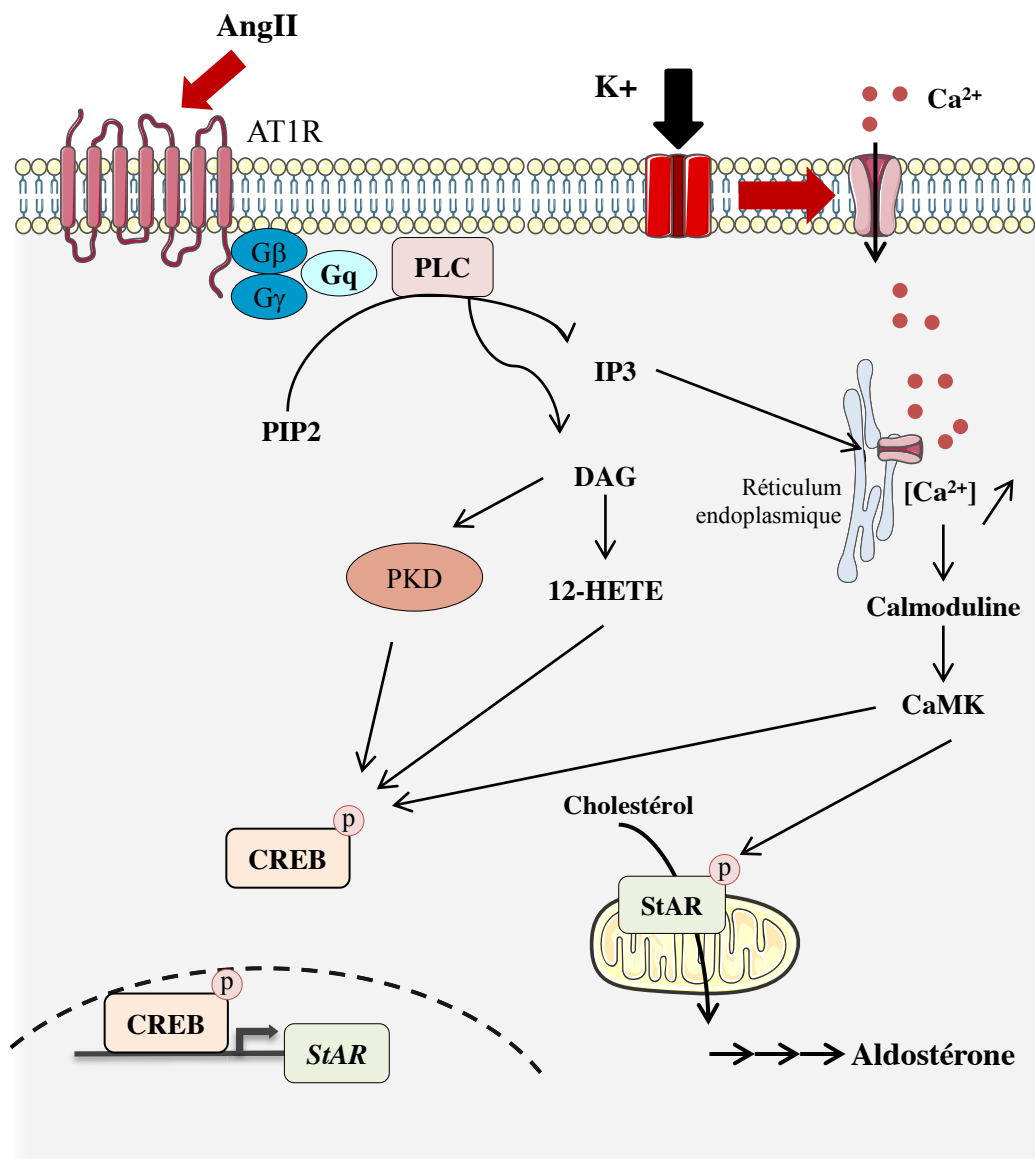
**Figure 4 : Stéroïdogénèse surrénalienne.**

R-LDL et SR-BI permettent l'entrée des LDL et HDL, respectivement. Une fois dans la cellule, le cholestérol pénètre dans la mitochondrie, grâce à la protéine StAR. Là, le cholestérol est clivé en prégnénolone par CYP11A1. Ce clivage libère également de l'isocaproaldéhyde, un aldéhyde toxique pour la cellule, qui peut être inactivé par l'enzyme Akkr1b7 chez la souris ou probablement AKR1B1 chez l'Homme. La prégnénolone est ensuite prise en charge par la 3βHSD, qui la convertit en progestérone. Cette dernière est ensuite hydroxylée par CYP21 permettant la formation de désoxycorticostérone. Dans la zone glomérulée, la désoxycorticostérone est convertie en aldostérone par CYP11B2. Dans la zone fasciculée, CYP11B1 permet la synthèse de cortisol chez l'Homme ou de corticostérone chez la souris. L'absence de CYP17 dans le cortex surrénalien adulte de la souris explique cette différence. Chez l'Homme CYP17 permet la synthèse de cortisol dans la fasciculée où son activité 17α-hydroxylase est favorisée. Dans la zone réticulée c'est l'activité 17,20-lyase de CYP17 qui est favorisée, permettant la production de DHEA. La DHEA peut être sulfaté par l'enzyme SULT2A.

Le cholestérol au niveau de la membrane interne de la mitochondrie est pris en charge par l'enzyme P450SCC (CYP11A1), présente dans les mitochondries de toutes les cellules stéroïdogènes. CYP11A1 clive la chaîne latérale du cholestérol, produisant ainsi la prégnénolone et l'isocaproaldéhyde. La prégnénolone est ensuite transportée au réticulum endoplasmique où la 3 $\beta$ HSD (3 $\beta$ -HydroxySteroid Dehydrogenase) la convertit en progestérone. La progestérone est hydroxylée par la cytochrome P450 21-hydroxylase (P450c21 ou CYP21) en déoxycorticostérone. Les étapes permettant la conversion du cholestérol en déoxycorticostérone sont communes à toutes les zones du cortex surrénalien. Au niveau de la zone glomérulée, la cytochrome P450 aldostérone synthase (P450c11AS ou CYP11B2) permet la synthèse d'aldostérone à partir de la déoxycorticostérone, alors que dans la zone fasciculée, la cytochrome P450 11 $\beta$  hydroxylase (P450c11 $\beta$  ou CYP11B1) forme le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez la souris. Cette différence est due à l'absence d'expression de la cytochrome P450 17 hydroxylase (P450c17 ou CYP17) dans le cortex surrénalien adulte de la souris (Keeney et al., 1995). CYP17 possède deux activités enzymatiques. L'activité 17 $\alpha$ -hydroxylase permet la production de cortisol dans la zone fasciculée. En revanche, dans la zone réticulée, l'activité 17,20-lyase est favorisée, permettant la production de DHEA (Rainey and Nakamura, 2008). La DHEA peut ensuite être sulfatée par SULT2A1 (Sulfotransferase family cytosolic 2A DHEA-preferring member 1) qui est majoritairement exprimée par les cellules de la zone réticulée (Rainey and Nakamura, 2008) (Figure 4).

#### **D/ Contrôle de la production des stéroïdes surrénaliens**

La synthèse des stéroïdes surrénaliens est sous le contrôle des hormones trophiques de la surrénale. L'angiotensine II, par l'intermédiaire de son récepteur AT1R (Angiotensin II Type I Receptor) agit sur les cellules de la zone glomérulée pour la production d'aldostérone. L'ACTH stimule la sécrétion de glucocorticoïdes par les cellules de la zone fasciculée via son récepteur MC2R (Melanocortin 2 receptor).



**Figure 5 : Régulation aigue de la sécrétion d'aldostérone.**

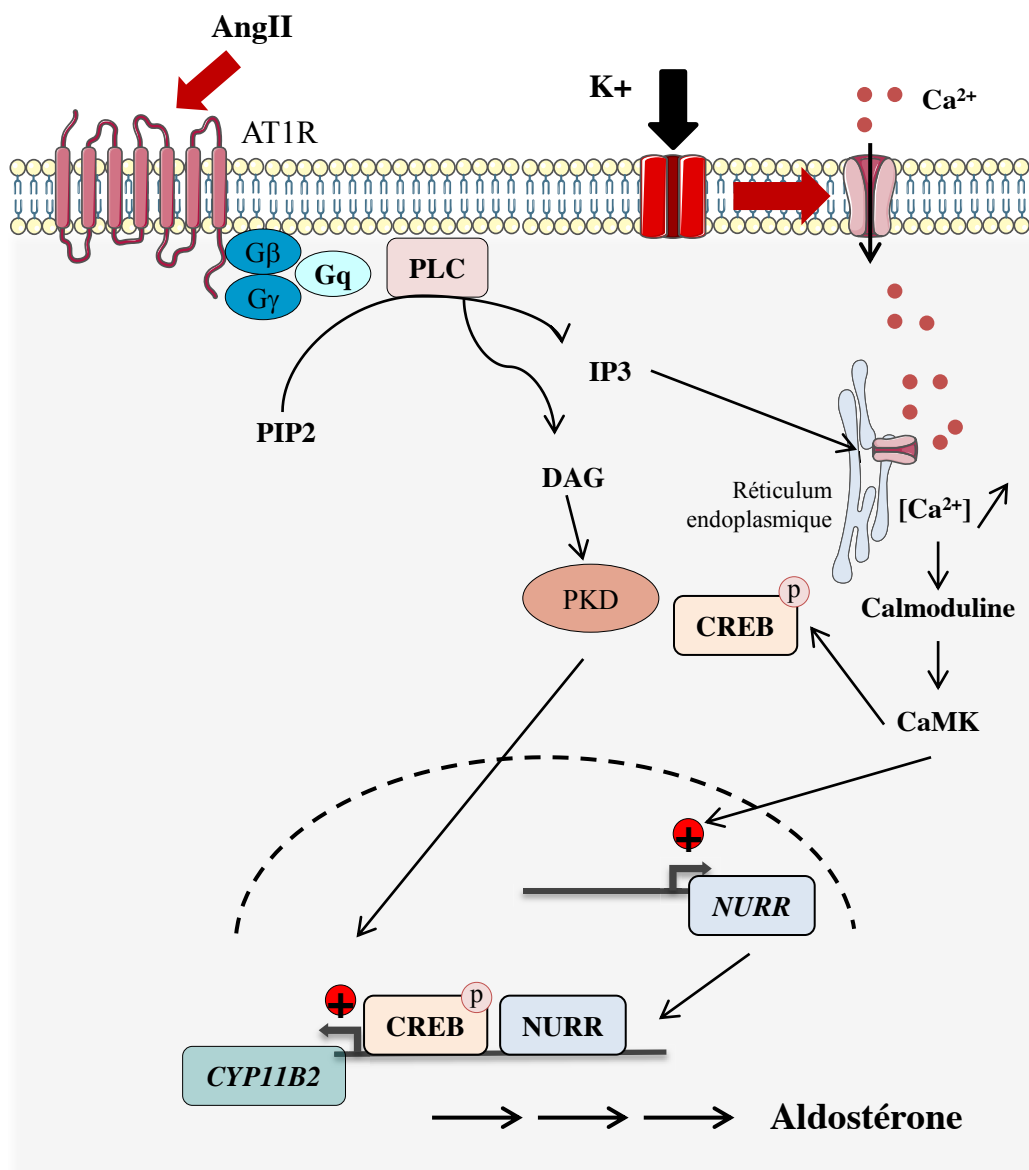
La liaison de l'angiotensine II (AngII) à son récepteur AT1R permet à la sous-unité Gq de la protéine G d'activer la PLC. Celle-ci assure la transformation du PIP2 en DAG et IP3. L'IP3 induit la sortie de calcium du réticulum endoplasmique. L'activation des canaux calciques par l'angiotensine II permet l'entrée calcium. Ces deux mécanismes sont à l'origine de l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Celui-ci en s'associant aux calmodulines permet l'activation des CaMK. Les CaMK phosphorylent le facteur de transcription CREB, impliqué dans la transcription de *StAR*. Le DAG peut également induire la phosphorylation et donc l'activité de CREB par l'intermédiaire de la PKD ou bien par son métabolite le 12-acide hydroxyeicosatetraénoïque (12-HETE). Les CaMK ont également la capacité de phosphoryler *StAR* ce qui augmente son activité. L'augmentation de la transcription de *StAR* et la stimulation de son activité induisent un transport accru de cholestérol au niveau de la membrane interne de la mitochondrie pour permettre la synthèse d'aldostérone. L'augmentation de la concentration extracellulaire en potassium permet l'activation des canaux calciques et donc de la même façon l'augmentation de la synthèse d'aldostérone. D'après Hattangady et al., 2012.

## 1. Régulation de la sécrétion d'aldostérone

La sécrétion d'aldostérone est régulée par l'angiotensine II, la concentration sérique en potassium ( $K^+$ ) et l'ACTH. Alors que l'angiotensine et le  $K^+$  induisent une réponse rapide (quelques minutes après la stimulation) et une réponse à plus long terme (quelques heures), l'ACTH agit uniquement à court terme sur la sécrétion d'aldostérone. La réponse rapide met en jeu la phosphorylation de StAR ainsi que la régulation de son expression. La réponse longue agit sur la transcription des enzymes de la stéroïdogenèse et en particulier *Cyp11b2* (Hattangady et al., 2012).

L'angiotensine II agit via son récepteur AT1R. Ce récepteur appartient à la classe des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. La liaison de l'angiotensine à son récepteur permet à la sous-unité Gq de la protéine G d'activer la phospholipase C (PLC). Celle-ci assure la transformation du PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en DAG (diacylglycerol) et IP3 (inositol triphosphate). L'IP3 mobilise le calcium du réticulum endoplasmique. L'ouverture des canaux calciques se fait également en réponse à l'angiotensine II. La concentration de calcium intracellulaire est donc augmentée. Ce calcium, en liant les calmodulines, permet l'activation des kinases dépendantes des calmodulines (CaMK). Les CaMK phosphorylent différents facteurs de transcription impliqués dans la transcription de gènes de la synthèse d'aldostérone, notamment le facteur de transcription CREB (cAMP respond element binding protein). La phosphorylation de CREB induit sa fixation sur ses éléments de réponse CRE (cAMP respond element) et le recrutement du co-activateur CBP (CRE Binding Protein) qui contacte la machinerie transcriptionnelle. CREB est recruté au niveau du promoteur de *StAR*. La transcription de *StAR* est donc augmentée et l'activité de la protéine est également stimulée par sa phosphorylation par les CaMK (Figure 5). Cette action sur la transcription du gène *StAR* et l'activité de la protéine se fait dans le cadre d'une réponse rapide à l'angiotensine II. Le cholestérol est donc rapidement transporté au niveau de la membrane interne de la mitochondrie afin de permettre la synthèse d'aldostérone. L'augmentation de la concentration extracellulaire en potassium permet également cette réponse rapide par l'activation des canaux calciques (Spät and Hunyady, 2004) (Figure 5). Une stimulation à l'ACTH est aussi à l'origine de cette réponse rapide par l'activation de la transcription de *StAR* et de sa phosphorylation. Ceci passe par sa liaison à son récepteur MC2R. L'activation de la voie résultant de cette interaction sera détaillée dans la suite. Toutefois une stimulation chronique d'ACTH a un effet inhibiteur sur la sécrétion





**Figure 6 : Régulation chronique de la sécrétion d'aldostérone.**

En liant son récepteur AT1R, l'angiotensine (AngII) permet l'activation de la phospholipase C (PLC) par la sous-unité Gq de la protéine G. La PLC permet la libération d'IP3 et de DAG, à partir de PIP2. Le DAG en activant la PKD permet la stimulation de l'expression de *CYP11B2*. L'IP3 induit la libération de calcium, permettant d'augmenter la concentration intracellulaire en calcium. Ceci est également permis par l'ouverture des canaux calciques en réponse à l'augmentation extracellulaire en potassium. Le calcium en liant les calmodulines permet d'activer les kinases dépendantes des calmodulines (CaMK). Les CaMK ont la capacité de stimuler la transcription des facteurs de transcription NURR, impliqués dans la régulation de l'expression des enzymes de la synthèse d'aldostérone, notamment *CYP11B2*. D'après Hattangady et al., 2012.

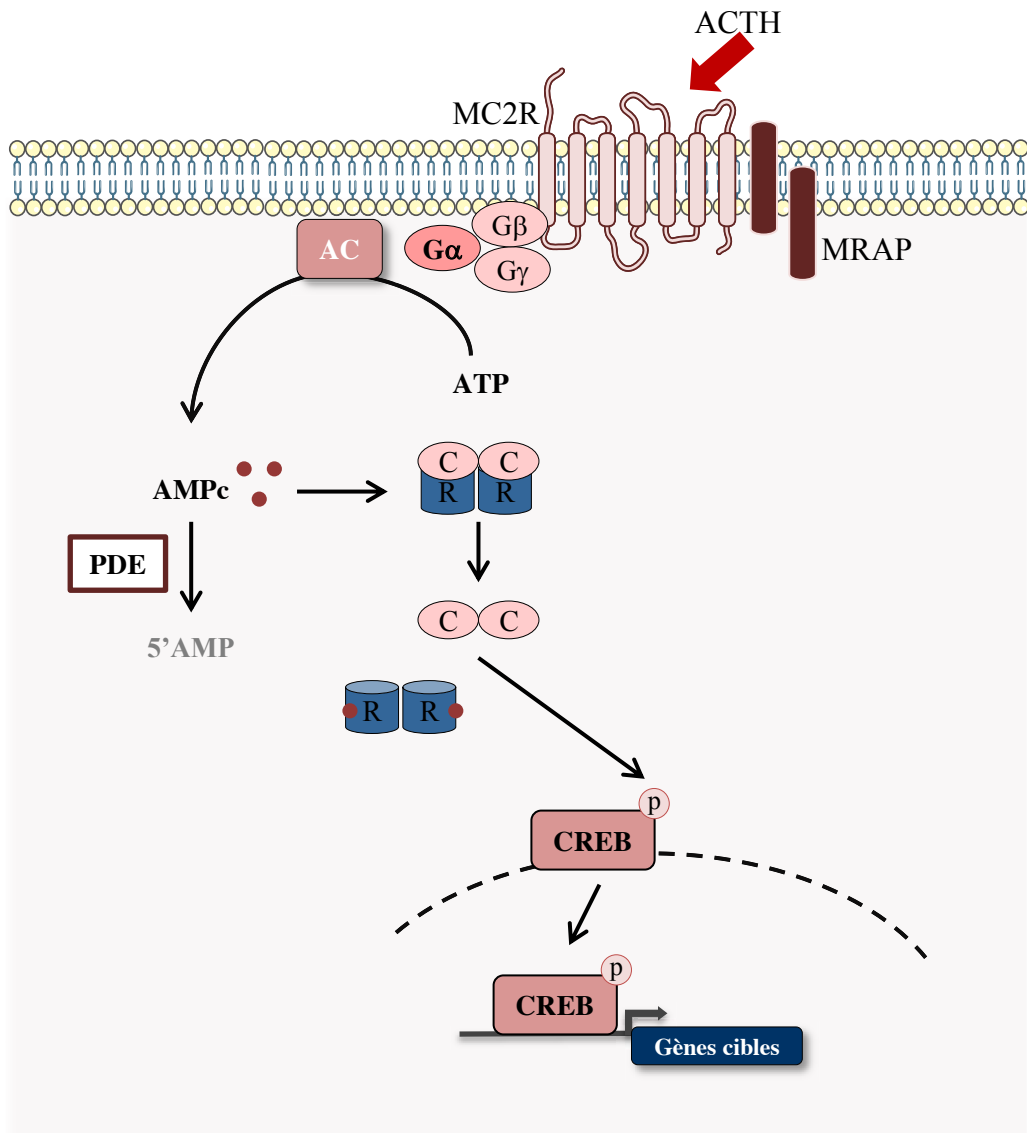
d'aldostérone (Fuchs-Hammoser et al., 1980; Holland and Carr, 1993). Le mécanisme à l'origine de cet effet n'est pas encore identifié.

La réponse à plus long terme met en jeu l'activation de la transcription des gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse d'aldostérone, notamment l'aldostérone synthase (Cyp11b2). Les CaMK stimulent alors des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de *Cyp11b2* (Hattangady et al., 2012). En plus du facteur CREB, les facteurs de transcription NURRs (NURR1 et NURR77) sont impliqués dans cette régulation (Bassett et al., 2004) (Figure 6).

## 2. Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes

La sécrétion des glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez la souris) par les cellules de la zone fasciculée est sous le contrôle de l'ACTH. L'ACTH agit via son récepteur MC2R. Cette interaction ligand-récepteur permet l'activation de la protéine kinase A (PKA), aboutissant à la transcription des gènes de la stéroïdogenèse.

MC2R est un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé à une protéine G. MC2R est essentiellement exprimé au niveau du cortex surrénalien. MC2R, en permettant la transduction du signal ACTH, joue un rôle essentiel dans la sécrétion de glucocorticoïdes (Novoselova et al., 2013). Ainsi des mutations dans le gène *MC2R* sont à l'origine d'une insuffisance en glucocorticoïdes dans le cadre du syndrome héréditaire de résistance à l'ACTH (familial glucocorticoid deficiency, FGD) (Clark et al., 1993). Toutefois de nombreux patients souffrent de FGD sans mutation du gène *MC2R*. Des analyses génétiques chez ces patients ont révélé la présence de mutations dans le gène *MRAP* (melanocortin 2 receptor accessory protein) (Metherell et al., 2005). Afin de comprendre le rôle des protéines MRAP, des analyses *in vitro* ont d'abord été conduites. Des expériences d'immunoprécipitation montrent que MC2R et MRAP interagissent et que ces protéines sont co-localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules ovariennes de hamster (cellules CHO) (Metherell et al., 2005). De plus, alors que MC2R ne se localise pas à la membrane cytoplasmique lorsqu'il est exprimé seul dans les cellules CHO, la co-expression de MRAP induit sa localisation à la membrane plasmique (Metherell et al., 2005). Les protéines MRAP sont donc importantes



**Figure 7: Régulation de la sécrétion de glucocorticoïdes.**

Par sa liaison à son récepteur MC2R, l'ACTH permet l'activation de la sous-unité  $G\alpha$  de la protéine G associée à ce récepteur. Cette sous-unité  $G\alpha$  active l'adénylate cyclase (AC) qui transforme l'ATP en AMPc. L'AMPc s'associe aux sous-unités régulatrices (R) de la PKA, permettant la libération et donc l'activation des sous-unités catalytiques (C). Les sous-unités catalytiques sont alors capables de phosphoryler de nombreuses cibles et notamment le facteur de transcription CREB. CREB phosphorylé se fixe sur ses éléments de réponse et induit la transcription de ses gènes cibles, dont *StAR*.

L'activité de la PKA peut en outre être contrôlée par des phosphodiestérases. Ces enzymes en hydrolysant l'AMPc jouent un rôle important dans la régulation de la concentration en AMPc et donc dans la régulation de l'activité PKA.

pour la fonction du récepteur à l'ACTH, notamment pour son affichage à la membrane plasmique.

MC2R est couplé à une protéine G. Les protéines G associées aux récepteurs à sept domaines transmembranaires sont composées de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). La sous-unité  $G\alpha$  fixe et hydrolyse le GTP (Guanosine TriPhosphate). Sans stimulation, la sous-unité  $G\alpha$  est liée au GDP (Guanosine DiPhosphate) et associée avec les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$ . La liaison de l'ACTH à son récepteur induit un changement de conformation de celui-ci et permet à la sous-unité  $G\alpha$  de fixer du GTP. Cette sous-unité est alors active et se dissocie des sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  et du récepteur. Le récepteur MC2R est couplé à une protéine G dont la sous-unité  $G\alpha$  a un effet stimulateur sur l'Adénylate cyclase (AC). Ainsi, après stimulation à l'ACTH, l'AC est stimulée et produit de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate Cyclique), un messenger secondaire activateur de la PKA, à partir d'ATP (Adénosine TriPhosphate) (Novoselova et al., 2013). Ce système d'activation est sous contrôle des PDE (Phosphodiesterases) qui sont des enzymes responsables de l'hydrolyse de l'AMPc. Elles jouent un rôle important dans la régulation des concentrations intracellulaires d'AMPc et inhibent donc la voie AMPc/PKA (Taskén and Aandahl, 2004).

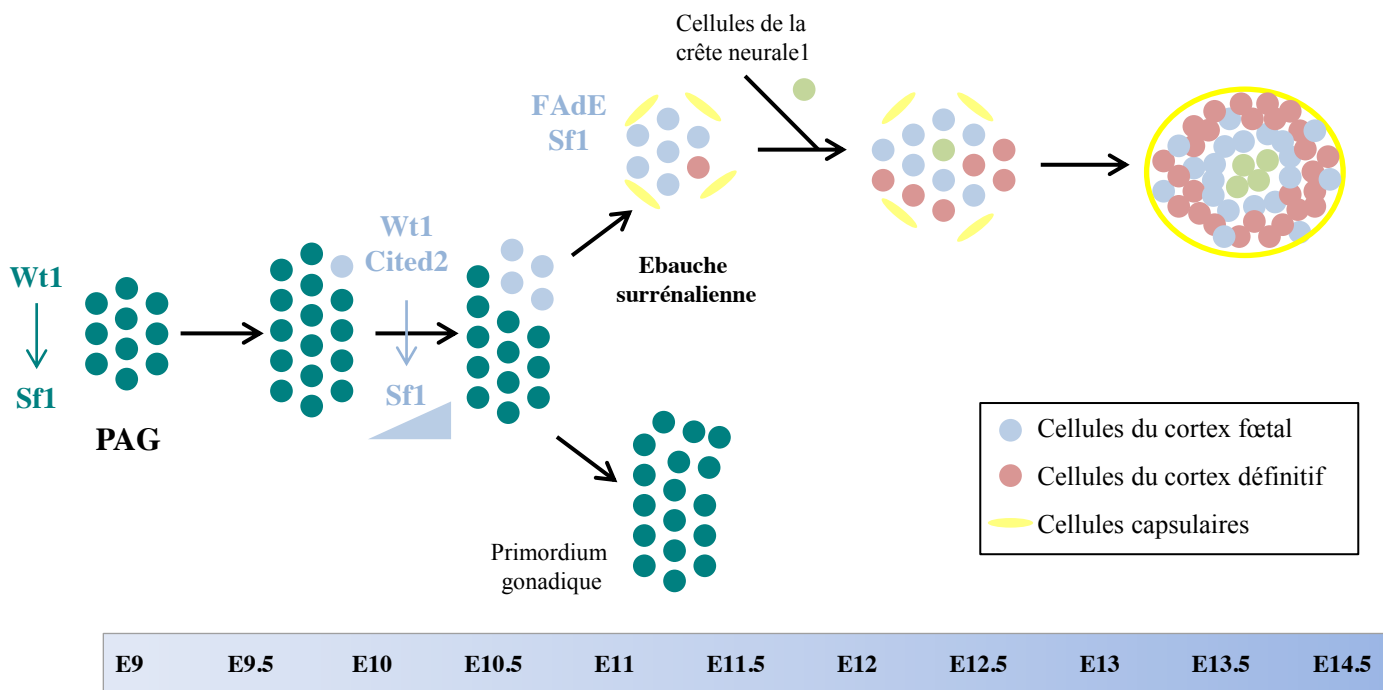
La PKA est une sérine thréonine kinase composée de quatre sous-unités : deux sous-unités régulatrices, chacune liée à une sous-unité catalytique. Il existe quatre sous-unités régulatrices,  $RI\alpha$ ,  $RI\beta$ ,  $RII\alpha$  et  $RII\beta$ , et quatre sous-unités catalytiques,  $C\alpha$ ,  $C\beta$ ,  $C\gamma$  et  $Prkx$ . Selon le type de sous-unités régulatrices mis en jeu, deux isoformes de PKA sont décrites PKA-I (sous-unité  $RI\alpha$  ou  $RI\beta$ ) et PKA-II (sous-unité  $RII\alpha$  ou  $RII\beta$ ). Les sous-unités régulatrices possèdent une affinité différente pour les molécules d'AMPc, les PKA-II présentant moins d'affinité que les PKA-I. Cette caractéristique, ainsi que l'expression différents en fonction des types cellulaires des sous-unités de la PKA assurent une diversité et une spécificité de réponse à l'AMPc (Taskén and Aandahl, 2004). La liaison de molécules d'AMPc aux sous-unités régulatrices de la PKA permet de libérer les sous-unités catalytiques. Les sous-unités catalytiques libérées sont alors capables de phosphoryler de nombreuses cibles cytoplasmiques et nucléaires. Parmi ses cibles, la PKA peut phosphoryler CREB sur sa sérine 133, entraînant la fixation de CREB sur ses éléments de réponse CRE et le recrutement du co-activateur CBP. Les éléments CRE sont retrouvés dans le promoteur de certains gènes de la stéroïdogénèse, notamment *Star* (Figure 7).



La localisation cellulaire de la PKA joue un rôle important dans les choix des substrats phosphorylés. Ce contrôle de localisation est réalisé par les protéines d'ancrage AKAP (A-kinase anchor protein) associées aux sous-unités régulatrices de la PKA. En plus de ce domaine de fixation à la PKA, les AKAP possèdent un signal de localisation cellulaire spécifique (Wong and Scott, 2004).

### **E/ Détoxification des produits secondaires de la stéroïdogénèse**

Le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par CYP11A1 libère la prégnénolone et l'isocaproaldéhyde, qui est un aldéhyde toxique pour la cellule. Il peut être inactivé par dégradation en dérivé alcoolique, grâce aux enzymes de la famille des aldo-céto réductases ou par oxydation en acide grâce aux aldéhydes déshydrogenases (Lefrancois-Martinez et al., 1999; Matsuura et al., 1996). Notre équipe a montré que l'activité de réduction de l'isocaproaldéhyde dans les cellules surrénaliennes Y1 est essentiellement assurée par l'aldose réductase Akr1b7 (Aigueperse et al., 1999, 2001; Lefrancois-Martinez et al., 1999). Chez l'Homme cette fonction de détoxification pourrait être assurée par AKR1B1, qui comme Akr1b7, voit son expression stimulée par l'ACTH (Lefrancois-Martinez et al., 2004).



**Figure 8 : Représentation schématique du développement de la surrénale chez la souris.**

Le cortex surrénalien et les gonades sont dérivés du primordium adrénogonadique (PAG). Les cellules du PAG se caractérisent par l'expression du facteur de transcription *Sf1*, dont l'expression est contrôlée dans le PAG par le facteur *Wt1*. A E10-E10.5, l'ébauche surrénalienne s'individualise du PAG. Le déclenchement de la différenciation de l'ébauche surrénalienne à partir du PAG est dépendante de la dose de *Sf1*. Dans les cellules qui donneront le cortex surrénalien, l'expression de *Sf1* est augmentée par l'interaction du co-facteur transcriptionnel *Cited2* avec *Wt1*. Après la séparation, les cellules cortico-surréaliennes expriment toujours *Sf1*, mais sous le contrôle d'un enhancer fœtal, le FAdE. A partir de E12, des cellules de la crête neurale envahissent l'ébauche surrénalienne et formeront la medulla. Une fois l'encapsulation de la surrénale achevée, le cortex définitif ou adulte se développe entre la zone fœtale (ou zone X) et la capsule.

D'après Val and Swain 2010.

### III. DEVELOPPEMENT ET MAINTIEN DE LA CORTICO-SURRENALE

Le développement de la cortico-surrénale suit des étapes relativement similaires chez l'Homme et la souris (Else and Hammer, 2005). L'utilisation de nombreux modèles murins transgéniques a permis de caractériser les facteurs et les voies de signalisation impliqués dans la mise en place et le maintien de la surrénale. Les données présentées à la suite, sont celles obtenues à partir de ces différents modèles animaux.

#### **A/ Développement embryonnaire**

##### **1. Le primordium adreno-gonadique et l'ébauche de surrénale**

Le cortex surrénalien et les gonades sont issus du primordium adrénogonadique (PAG) qui se sépare en ébauche surrénalienne et gonadique à E10 (10 jours de développement embryonnaire) (Figure 8). Le PAG se forme à partir des cellules de l'épithélium cœlomique et du mésoderme intermédiaire au niveau de la crête urogénitale. A E9 chez la souris, le PAG est identifiable et caractérisé par l'expression du facteur de transcription Sf1 (Steroidogenic factor 1 ou adrenal 4 binding protein Ad4BP ou nuclear receptor subfamily 5, groupe A, membre 1 NR5A1) (Hatano et al., 1996). Sf1 a été identifié comme un facteur de transcription liant des séquences spécifiques au niveau des promoteurs des gènes de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse (Honda et al., 1993; Lala et al., 1992; Morohashi et al., 1992). Sf1 est un facteur indispensable à l'identité stéroïdogène des cellules qui est aussi essentiel au développement des surrénales et gonades. Ceci a été mis en évidence par l'analyse de souris invalidées pour ce facteur qui ne présentent pas de surrénales ni de gonades à la naissance (Luo et al., 1994; Sadovsky et al., 1995). Le déficit en glucocorticoïdes, causé par l'agénésie surrénalienne, ne permet pas la survie de ces animaux au-delà de quelques jours (Luo et al., 1994). L'absence de surrénales et de gonades à la naissance est causée par l'apoptose des cellules du PAG et de l'ébauche de surrénale entre E11.5 et E12.5 (Bland et al., 2004; Luo et al., 1994). Sf1 permet donc le maintien de ces cellules. Ce rôle de Sf1 pourrait s'expliquer par son action répressive sur l'expression du facteur pro-apoptotique NOV/CCN3 (Doghman et al., 2007a, 2007b). Sf1 est donc indispensable au maintien du PAG et donc au développement des gonades et des surrénales. Son expression dans ce primordium est régulée





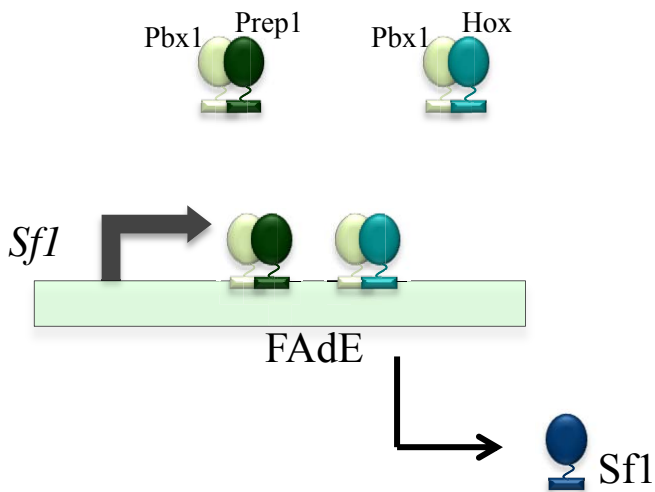
par le facteur de transcription *Wt1* (Wilms tumeur 1). *Wt1* est détecté dès E9 dans le mésoderme intermédiaire (Moore et al., 1998). L'implication de *Wt1* dans l'expression de *Sf1* a été démontrée par l'utilisation d'un modèle d'inactivation du gène *Wt1* (Wilhelm and Englert, 2002). L'expression de *Sf1* n'est plus détectée chez ces animaux qui reproduisent le phénotype des souris invalidées pour *Sf1*, c'est-à-dire l'absence de développement de gonades et de surrénales. Les auteurs ont également démontré le recrutement de *Wt1* au niveau de sites spécifiques du promoteur de *Sf1* (Wilhelm and Englert, 2002). Ces données prouvent l'implication du facteur de transcription *Wt1* dans l'initiation et le contrôle de la transcription de *Sf1* dans le PAG.

## 2. Surrénale fœtale

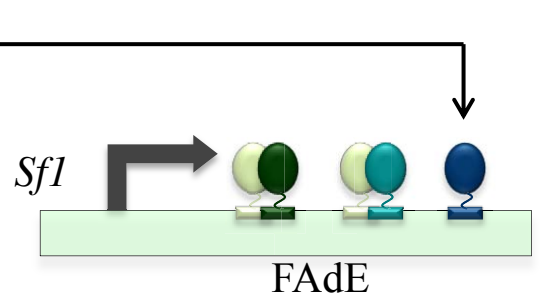
A E10.5 chez la souris, l'ébauche surrénalienne s'individualise dans la partie rostrale du PAG et migre en direction de l'aorte dorsale (Figure 8). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement des ébauches surrénalienne et gonadique ont pu être mis en évidence par l'étude des différents modèles génétiques présentant des altérations dans le développement des surrénales sans atteinte ou avec des altérations modérées du développement des gonades.

Les souris hétérozygotes pour l'inactivation de *Sf1* (*Sf1*<sup>+/-</sup>) présentent une réduction forte de la taille des surrénales fœtales et adultes mais leurs gonades se développent normalement et sont fonctionnelles à l'âge adulte (Babu et al., 2002; Bland et al., 2004). Ceci suggère que *Sf1* agit de manière dose-dépendante pour induire le développement des dérivés du PAG. Chez la souris, le développement de l'ébauche de surrénale nécessiterait donc un dosage de *Sf1* plus élevé que le développement gonadique. Conformément à cette hypothèse, la réexpression de *Sf1* à partir d'un transgène chez les souris *Sf1*<sup>-/-</sup>, conduit à une restauration du développement gonadique, mais pas surrénalien (Fatchiyah et al., 2006). L'analyse des souris invalidées pour le co-facteur transcriptionnel *Cited2* (CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail 2) a permis de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans l'augmentation du dosage de *Sf1* dans l'ébauche de surrénale. Celles-ci présentent une agénésie surrénalienne alors que le développement des gonades est initié (Bamforth et al., 2001). *Cited2* est un co-facteur transcriptionnel dépourvu de domaine de fixation à l'ADN qui peut agir comme co-activateur ou co-répresseur (Bhattacharya et al., 1999; Chou et al., 2006). Dans la surrénale, *Cited2* est fortement exprimé dans le PAG et après la séparation des

## 1- Initiation de l'expression de *Sf1*



## 2- Maintien de l'expression de *Sf1*



**Figure 9 : Régulation de l'expression de *Sf1* dans la surrénale fœtale .**

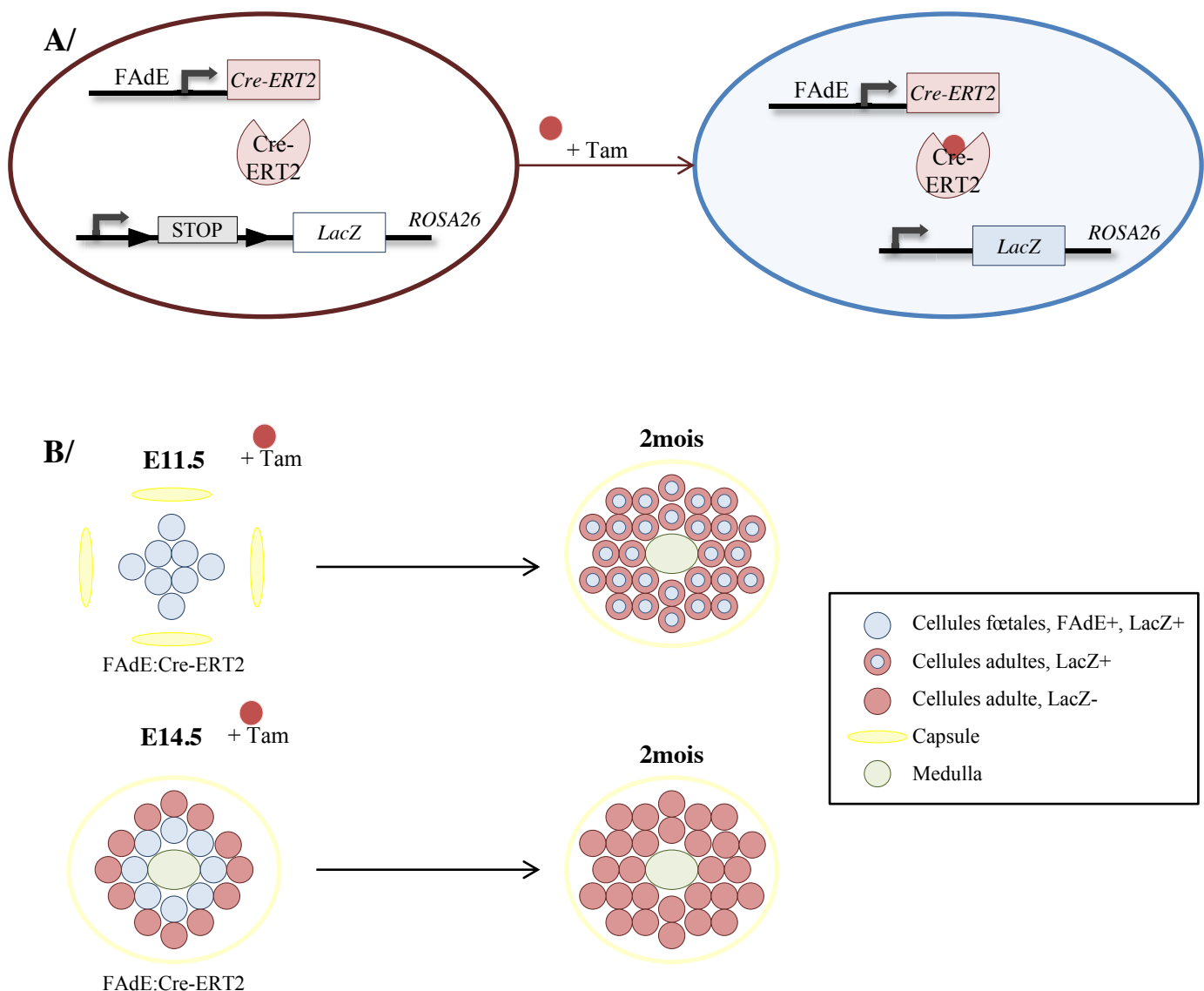
Les facteurs de transcription Pbx/Hox et Pbx/Prep1 permettent l'initiation de l'expression de *Sf1* à partir de l'enhancer fœtal FAdE, dans les cellules cortico-surrénaliennes fœtales. Le facteur de transcription Sf1 alors produit se lie au FAdE et permet le maintien de son expression.

D'après Gardiner et al., 2012.

ébauches surrénaliennne et gonadique, son expression reste forte dans les surrénales mais faible dans les gonades (Val et al., 2007). Chez les souris invalidées pour *Cited2*, l'expression de *Sfl* est diminuée dans le PAG et le primordium surrénalien, indiquant un rôle de ce co-facteur dans la régulation de l'expression de *Sfl* (Val et al., 2007). Des analyses *in vitro* ont démontré une interaction physique et fonctionnelle entre *Wt1* et *Cited2*, permettant la stimulation de l'expression de *Sfl* (Val et al., 2007). L'ensemble de ces données met en évidence l'importance de la dose de *Sfl* dans la différenciation surrénaliennne et le rôle clé de l'interaction entre *Cited2* et *Wt1*, pour permettre l'augmentation d'expression de ce facteur de transcription et donc le déclenchement de la différenciation surrénaliennne à partir du PAG.

Après la séparation, les cellules surrénaliennnes fœtales continuent d'exprimer *Sfl* mais l'expression de *Wt1* est éteinte. Des modèles de gain de fonction de *Wt1* dans le PAG et l'ébauche de surrénale ont permis de montrer que la répression de *Wt1* est indispensable pour la différenciation des cellules du PAG en cellules surrénaliennnes (Bandiera et al., 2013). Ainsi d'autres activateurs transcriptionnels doivent prendre le relais de *Wt1* dans la surrénale fœtale pour permettre le maintien de l'expression de *Sfl*. En 2006, Zubair et ses collaborateurs ont démontré que l'expression de *Sfl* est maintenue dans la surrénale fœtale grâce à un enhancer particulier, localisé dans le quatrième exon du gène *Sfl*. Le FAdE (Fetal Adrenal Enhancer) contient des sites de fixation pour les facteurs de transcription *Pbx/Hox*, *Pbx/Prep* et *Sfl*. Les auteurs ont mis en évidence une régulation de l'expression de *Sfl* dans la surrénale fœtale, en deux étapes (Figure 9) : les facteurs de transcriptions *Pbx/Hox* et *Pbx/Preb* permettent l'initiation de l'expression de *Sfl* puis *Sfl* lui-même va assurer le maintien de son expression (Zubair et al., 2006).

A E12, le cortex fœtal est colonisé par des cellules de la crête neurale (les sympathogonies) qui vont former la medullo-surrénale. L'encapsulation de la surrénale par des cellules mésenchymateuses se fait après cette étape. Elle est complète à E14.5. Après la mise en place de la capsule, le cortex définitif ou adulte se développe entre celle-ci et la zone fœtale (Keegan and Hammer, 2002).



**Figure 10 : Devenir des cellules du cortex fœtal.**

**A/** Schéma du système de lignage utilisé afin d'évaluer la contribution des cellules fœtales au cortex adulte. La recombinaise Cre-ERT2 est placée sous le contrôle du promoteur fœtal de *Sf1*, le FAdE. Cette recombinaise est inactive en absence de tamoxifène. Au locus *ROSA26* (ubiquitaire) a été inséré un gène *LacZ*, codant la  $\beta$ -galactosidase, dont l'expression dépend de la recombinaison de deux sites LoxP. L'induction au tamoxifène permet d'activer la Cre qui va pouvoir recombinaison les sites LoxP et donc permettre l'expression de la  $\beta$ -galactosidase. L'apport du substrat de cette enzyme permettra de marquer les cellules ayant subi la recombinaison et leurs descendantes en bleu.

**B/** A E11.5, l'ébauche surrénalienne se compose de cellules fœtales exprimant *Sf1* sous le contrôle de l'enhancer fœtal FAdE. L'induction tamoxifène à ce stade va permettre de marquer l'ensemble de ces cellules. L'analyse de ces animaux à 2 mois après la naissance montre que l'ensemble du cortex adulte est marqué. A cet âge, la zone fœtale (ou zone X) a régressé. Les cellules du cortex adulte sont donc les descendantes des cellules fœtales à E11.5.

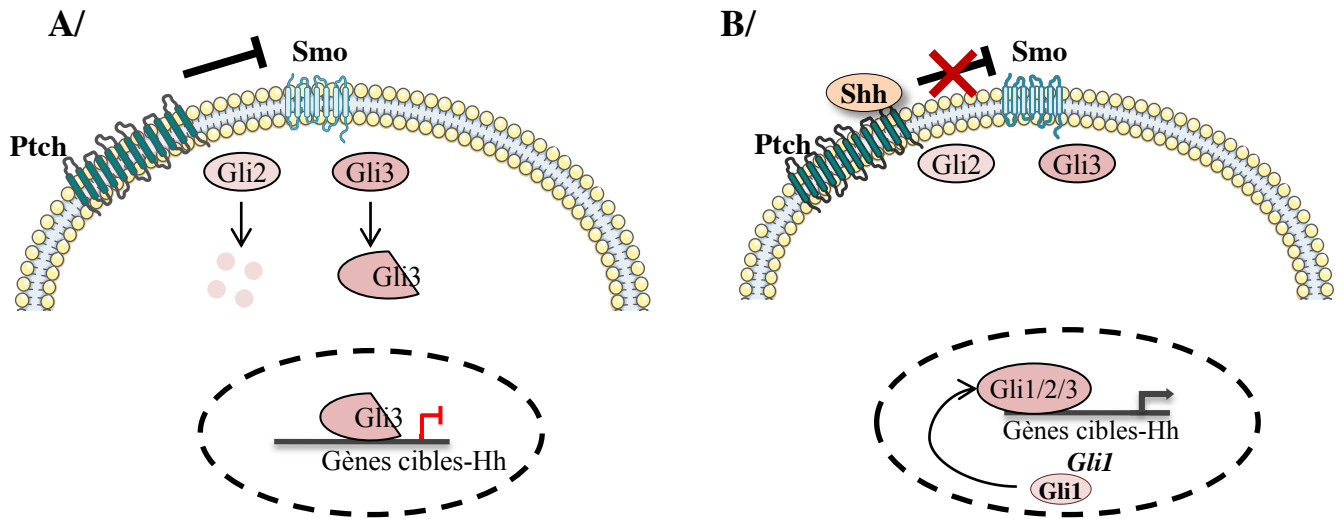
A E14.5, le cortex surrénalien se compose des cellules du cortex définitif, n'exprimant plus *Sf1* à partir du FAdE mais à partir d'un enhancer adulte, et de cellules de la zone fœtale. L'induction tamoxifène à ce stade marque donc seulement les cellules fœtales (FAdE+). L'analyse de des animaux traités à E14.5 à 2 mois après la naissance n'a révélé aucune cellule marquée. Ainsi à E14.5, les cellules fœtales n'ont plus la capacité de contribuer au cortex adulte.

### 3. Du cortex fœtal au cortex adulte

#### *a/ Devenir des cellules exprimant le FAdE*

Après la naissance chez la souris, le cortex surrénalien est composé de deux populations cellulaires : le cortex définitif, divisé en zone glomérulée et fasciculée et la zone X, située entre la fasciculée et la medulla. Cette zone dont le rôle physiologique n'est pas encore établi se maintient jusqu'à la puberté chez le mâle et la première gestation chez la femelle (Hershkovitz et al., 2007). Sa localisation suggérait qu'elle pouvait correspondre à la zone fœtale du cortex humain qui disparaît peu après la naissance. L'analyse des souris transgéniques exprimant le gène rapporteur LacZ sous contrôle du FAdE de *Sf1* a permis de montrer que la zone X était effectivement dérivée de cellules corticales fœtales exprimant le FAdE (Zubair et al., 2006).

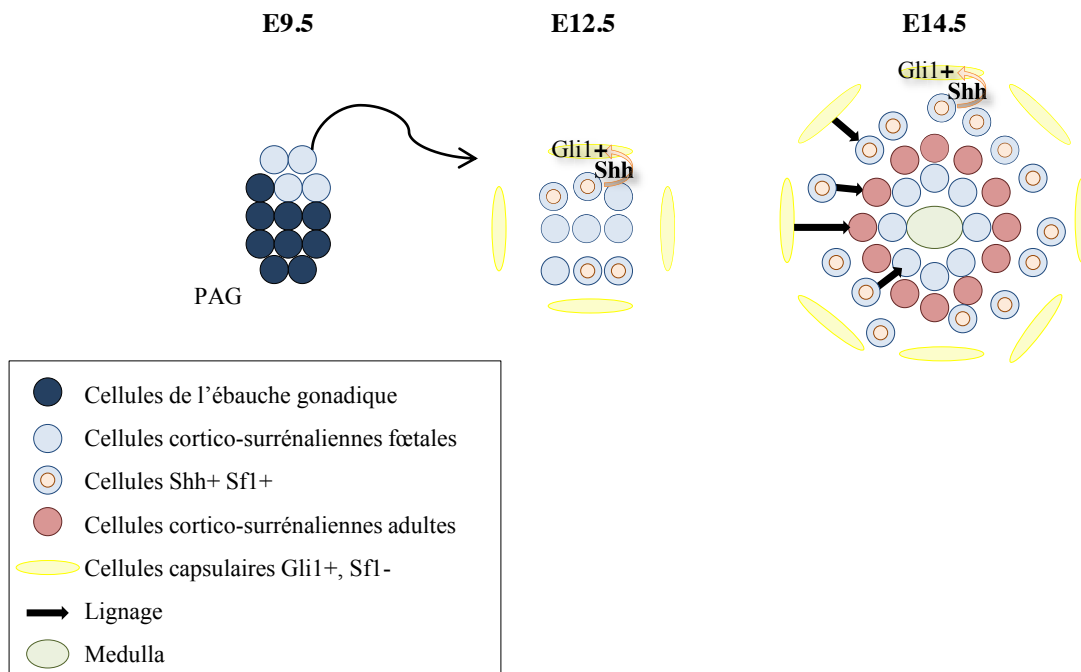
Si ces données montrent l'existence d'un lien direct entre cellules fœtales et zone X, elles ne permettent pas d'identifier les cellules à l'origine du cortex adulte. Afin d'évaluer la contribution des cellules fœtales au développement des cellules corticales définitives, Zubair et ses collaborateurs ont donc utilisé un modèle murin de lignage cellulaire dans lequel la recombinaison Cre a été placée sous le contrôle du promoteur fœtal de *Sf1* (FAdE). Les souris générées ont été croisées avec des souris portant un gène *LacZ* au locus ubiquitaire *ROSA26*, dont l'expression dépend de la recombinaison de deux sites LoxP par la recombinaison Cre (Zubair et al., 2008). Les cellules ayant exprimé le FAdE portent donc un locus *ROSA26* recombiné leur permettant, ainsi qu'à leurs descendantes, d'exprimer la  $\beta$ -galactosidase. L'analyse de ces souris a mis en évidence une activité LacZ dans le cortex définitif des souris jusqu'à deux mois après la naissance (Zubair et al., 2008). Ces résultats permettent de conclure que les cellules fœtales du cortex surrénalien sont à l'origine des cellules du cortex définitif. Toutefois, la même étude a permis, grâce à l'utilisation d'une recombinaison Cre inductible, de démontrer que les cellules fœtales contribuent au cortex définitif avant E14.5, alors qu'au-delà ces cellules n'en ont plus la capacité (Zubair et al., 2008) (Figure 10). Les auteurs ont donc émis l'hypothèse qu'à ce stade de développement, les cellules fœtales subissaient une transition pour devenir des cellules adultes. Dans ces cellules, l'expression de *Sf1* ne serait donc plus dirigée par le FAdE mais par un enhancer adulte qui n'est pas encore identifié.



**Figure 11 : Représentation schématique de la signalisation Hedgehog.**

**A/** En absence de ligand, le récepteur Patched (Ptc) exerce une action inhibitrice sur le récepteur Smoothened (Smo). Cette inhibition conduit à la dégradation du facteur de transcription Gli2 et à la protéolyse du facteur Gli3. Cette forme tronquée de Gli3 agit comme un répresseur transcriptionnel des gènes cibles de la voie Hh.

**B/** La liaison du ligand Shh lève l'inhibition exercée par Ptc sur Smo. Les facteurs de transcription Gli2 et Gli3 peuvent alors agir comme activateur transcriptionnel. Le facteur de transcription Gli1 est un des gènes cibles de la voie Hh et agit comme un activateur des gènes cibles de la voie.



**Figure 12: La signalisation Hedgehog dans le développement cortico-surrénalien.**

Parmi les cellules de l'ébauche surrénalienne (Sf1+) provenant du PAG certaines vont exprimer le ligand Shh en réponse à un signal restant à déterminer. Les cellules recevant le signal Shh sont les cellules capsulaires Gli1+ non stéroïdogènes (Sf1-). Les cellules Shh+, Sf1+ ont la capacité de se différencier en cellules du cortex définitif et en cellules fœtales. Les cellules Gli1+ peuvent acquérir une identité Shh+ Sf1+ et également se différencier en cellules du cortex adulte.

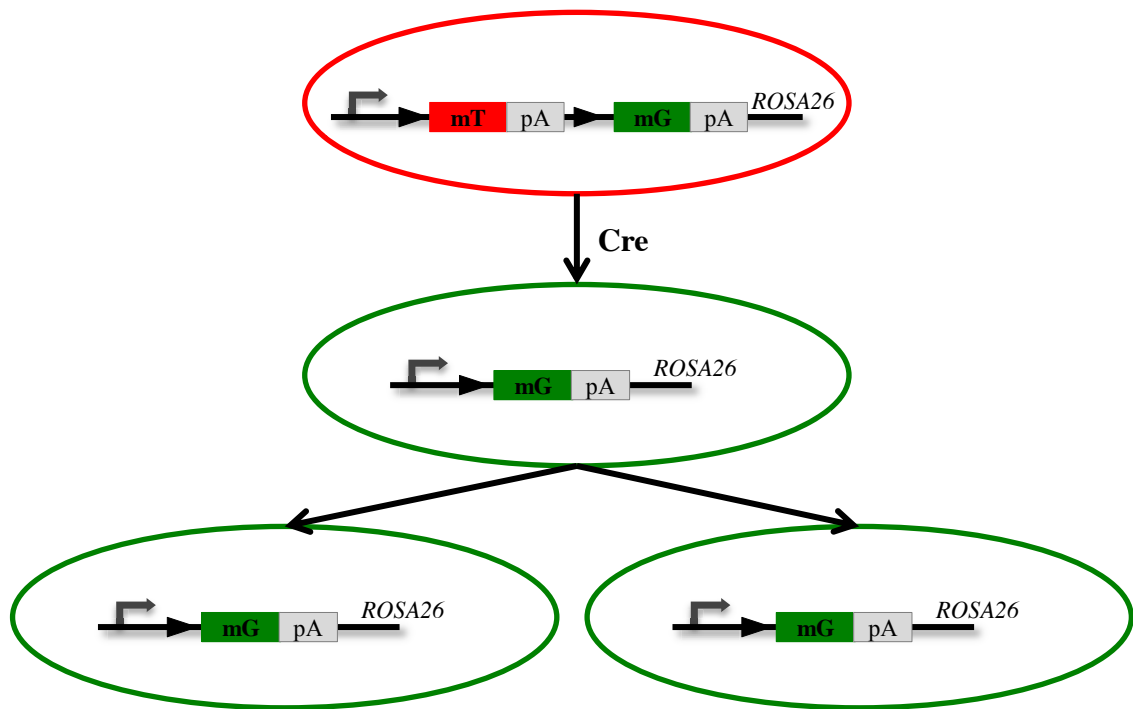
### ***b/ Implication de cellules indifférenciées : rôle de la signalisation Hedgehog***

Les observations ci-dessus, même si elles mettent en évidence une large contribution des cellules fœtales exprimant le FAdE, n'excluent pas la mobilisation d'autres types cellulaires pour l'établissement du cortex adulte. C'est ce que suggèrent les analyses du rôle de la voie de signalisation Hedgehog (Hh) dans le développement cortical.

Cette voie repose sur trois ligands Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) et Indian Hedgehog (Ihh). Ces protéines sécrétées agissent en liant à la surface des cellules le récepteur Patched1 (Ptch1). En absence de ligand, Ptch1, par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé, inhibe le récepteur à sept domaines transmembranaires Smoothened (Smo). La liaison des ligands Hedgehog à Ptch1 conduit à l'activation de Smo. Ptch1 et Smo vont agir par l'intermédiaire des facteurs de transcription Gli. En absence de ligand, l'inhibition de Smo conduit à la dégradation du facteur de transcription Gli2, alors que la protéolyse de Gli3 aboutit à une forme tronquée de ce facteur agissant comme un répresseur transcriptionnel des gènes cibles de la voie (Figure 11A). La liaison des ligands à Ptch1 lève l'inhibition sur Smo. Les facteurs de transcription Gli2 et Gli3 ne sont plus dégradés et peuvent agir comme activateurs transcriptionnels (Ingham et al., 2011) (Figure 11B). Gli1, qui agit uniquement comme un activateur transcriptionnel des gènes cibles de la voie, n'est exprimé que lors de l'activation de cette voie de signalisation, ce qui en fait un marqueur des cellules où la signalisation Hh est mobilisée (King et al., 2008; Laufer et al., 2012).

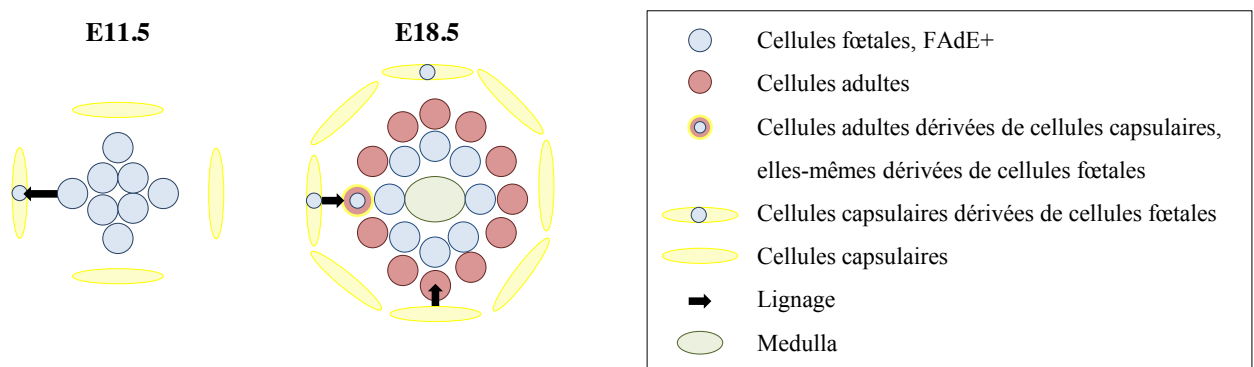
Shh est le seul ligand de la voie Hh à être exprimé dans la surrénale à partir de E11.5 (King et al., 2009). A E12.5, il est localisé à la périphérie du cortex dans des cellules exprimant Sf1 (King et al., 2009). Comme pour les cellules exprimant le FAdE, les expériences de lignage reposant sur les régions régulatrices de Shh ont mis en évidence une contribution des cellules Shh+ à l'ensemble des types cellulaires corticaux définitifs ainsi qu'à la zone X (King et al., 2009) (Figure 12). Toutefois, contrairement aux cellules exprimant le FAdE, les cellules Shh+ contribuent au développement du cortex adulte, même après E14.5. Les cellules recevant le signal Hh, marquées par le facteur de transcription Gli1, sont localisées au niveau de la capsule et sous la capsule et n'expriment pas Sf1 (Ching and Vilain, 2009; Huang et al., 2010; King et al., 2009). Des expériences de lignage ont montré que les descendants des cellules Gli1+ à E14.5 exprimaient Sf1 et pouvaient contribuer à l'ensemble des lignages du cortex définitif. Certains descendants exprimaient également Shh, suggérant





**Figure 13: Système de lignage mTmG.**

La construction mTmG est insérée au locus ubiquitaire *ROSA26*. Avant l'action de la recombinaison Cre, la séquence mT est exprimée et code une protéine Tomato ayant une localisation membranaire. Ceci permet donc un marquage rouge des cellules. Après action de la recombinaison Cre, la séquence mT est excisée et c'est la séquence mG qui s'exprime. Cette séquence code la protéine GFP ayant un signal de localisation membranaire. Les cellules ayant subi la recombinaison, ainsi que leurs descendantes sont marquées en vert.



**Figure 14 : Développement du cortex adulte à partir des cellules fœtales ayant d'abord acquis une identité de cellule capsulaire.**

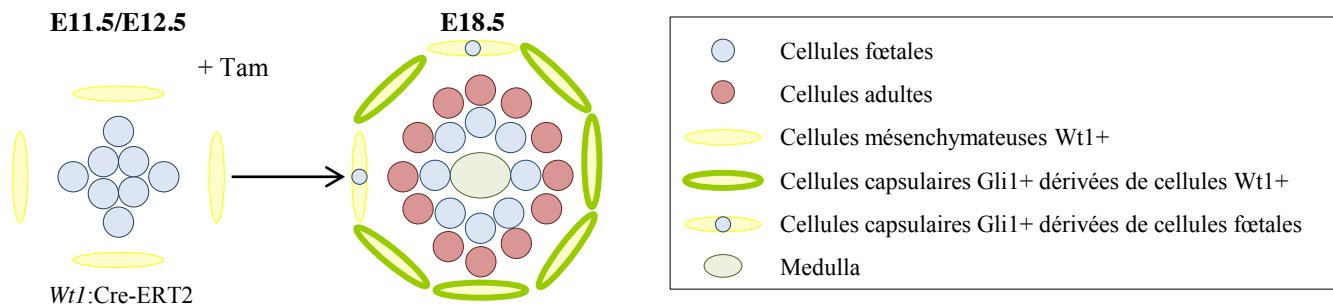
A E11.5, les cellules fœtales cortico-surrénales expriment *Sf1* (*Sf1*<sup>+</sup>) à partir de l'enhancer fœtal FAdE. L'utilisation d'un système rapporteur mTmG a montré que les cellules FAdE peuvent devenir des cellules capsulaires *Gli1*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>-</sup>, ce que le rapporteur LacZ, moins sensible n'avait pas pu mettre en évidence (Zubair et al., 2008). Ces cellules capsulaires *Gli1*<sup>+</sup> ont la capacité de se différencier en cellules cortico-surrénales (King et al., 2009). Les cellules fœtales pourraient donc dans un premier temps acquérir une identité *Gli1*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>-</sup>. Puis ces cellules *Gli1*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>-</sup>, dérivées de cellules fœtales, pourraient engendrer des cellules cortico-surrénales adultes. Toutefois seule une petite partie des cellules capsulaires sont dérivées de cellules FAdE. Les autres cellules capsulaires *Gli1*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>-</sup> pourraient également être à l'origine de cellules cortico-surrénales adultes.

que les cellules Gli1+ qui répondent au signal Hh pouvaient à leur tour donner naissance à des cellules Shh+ (King et al., 2009) (Figure 12).

L'ensemble de ces données suggère l'existence de deux lignages cellulaires au cours du développement de la cortico-surrénale (Figure 12). Un premier lignage cellulaire provient du PAG et exprime *Sfl* sous contrôle du FAdE. En réponse à un signal restant à déterminer, une sous-population de ces cellules Sfl+, localisée à la périphérie du cortex, exprime le ligand Shh. Les cellules Sfl+ Shh+ peuvent générer des cellules stéroïdogéniques corticales. La sécrétion du ligand Shh va permettre l'induction de l'expression du facteur Gli1 par les cellules capsulaires et sous-capsulaires. Ces cellules Gli1+ vont pouvoir se différencier en cellules du cortex, à l'origine d'un second lignage cellulaire. Le cortex surrénalien adulte serait donc composé de cellules provenant du PAG et de cellules mésenchymateuses formant la capsule surrénalienne (King et al., 2009; Laufer et al., 2012). Ce modèle est en apparente contradiction avec les observations mettant en évidence une contribution des cellules FAdE+ au développement de l'ensemble des cellules du cortex définitif.

Les récents travaux de l'équipe du Dr Hammer proposent un modèle intégrant ces deux observations. En effet, des expériences de lignage utilisant la recombinaise Cre sous contrôle du FAdE et le système rapporteur mTmG placé au locus ROSA26 (Figure 13) ont permis de mettre en évidence des descendants des cellules stéroïdogènes ayant exprimé le FAdE dans environ 6% des cellules capsulaires à E18.5 (Wood et al., 2013). Ces cellules capsulaires dérivées des cellules corticales fœtales n'expriment pas Sfl mais expriment Gli1 dans leur grande majorité (Wood et al., 2013). Ces données montrent donc que les cellules du cortex fœtal pourraient être à l'origine de cellules capsulaires Gli1+ qui se différencient par la suite en cellules du cortex définitif (Figure 14).

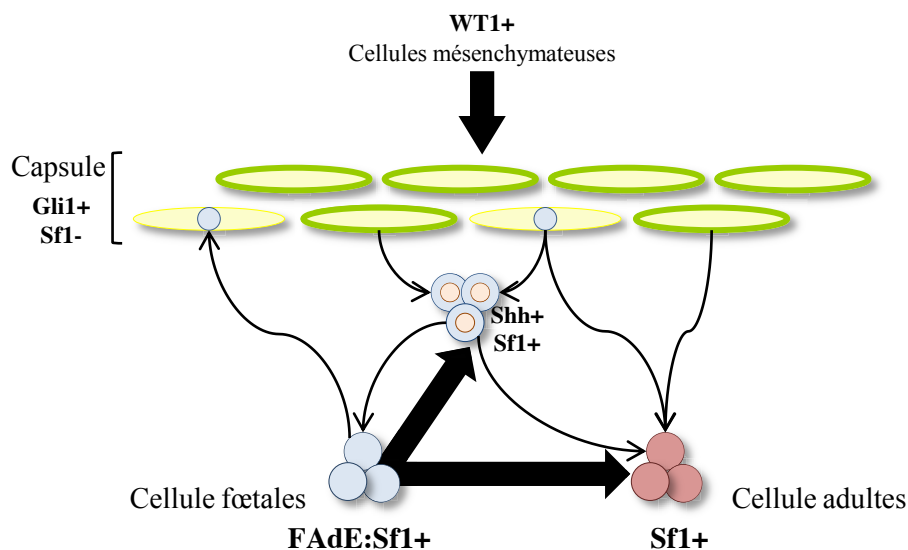
Toutefois, les cellules capsulaires ne semblent pas dériver uniquement de cellules surrénaliennes fœtales. L'équipe de A. Schedl a utilisé une lignée murine exprimant une recombinaise Cre inductible sous le contrôle du promoteur *Wt1* et possédant un gène rapporteur mTmG (Bandiera et al., 2013). L'activité de la Cre a été induite par injection de tamoxifène à E11.5 et E12.5. A ce stade, les cellules de l'ébauche surrénalienne n'expriment plus le facteur de transcription Wt1. Toutefois Wt1 est exprimé par des cellules mésenchymateuses entourant la surrénale en formation. Les auteurs ont pu observer qu'à E18.5, la majorité des cellules de la capsule sont GFP+ (Bandiera et al., 2013). Ainsi une proportion importante de cellules capsulaires doit dériver de cellules mésenchymateuses et



**Figure 15 : Origine des cellules capsulaires du cortex surrénalien.**

Afin d'identifier l'origine des cellules capsulaires du cortex surrénalien, une expérience de lignage avec une Cre inducible (Cre-ERT2) sous le contrôle des régions régulatrices de *Wt1* et un système rapporteur mTmG ont été utilisés.

L'induction de la Cre par le tamoxifène a été réalisée à E11.5 et E12.5. A ce stade, les cellules mésenchymateuses entourant la surrénale en formation expriment le facteur de transcription *Wt1*, au contraire des cellules cortico-surrénaliennes. Ainsi seules ces cellules *Wt1*<sup>+</sup> subissent la recombinaison et expriment la protéine GFP. L'analyse des surrénales à E18.5 met en évidence une majorité de cellules capsulaires GFP<sup>+</sup>, démontrant l'origine mésenchymateuse de ces cellules. Une partie des cellules capsulaires ne sont pas marquées par la GFP et pourraient donc avoir pour origine les cellules fœtales surrénaliennes (Figure 14). Ces deux types de cellules capsulaires n'expriment pas *Sf1*, mais expriment le facteur *Gli1*.



**Figure 16: Représentation schématique de l'origine des cellules capsulaires et du cortex surrénalien adulte.**

Origine des cellules capsulaires *Gli1*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>-</sup> : les cellules capsulaires semblent en majorité dériver de cellules mésenchymateuses *Wt1*<sup>+</sup>. Une partie des cellules capsulaires peut toutefois provenir de cellules cortico-surrénaliennes fœtales (FAdE:Sf1<sup>+</sup>).

Origine des cellules cortico-surrénaliennes adultes : les cellules du cortex définitif sont majoritairement dérivées de cellules fœtales. Les cellules capsulaires peuvent également contribuer au cortex adulte, quelle que soit leur origine. Une troisième population de cellules peut contribuer au développement du cortex adulte, les cellules *Shh*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>+</sup>. Ces cellules dérivent en partie d'une sous-population de cellules du PAG (cellules fœtales) qui vont exprimer le ligand *Shh* lors de la mise en place de l'ébauche surrénalienne. Ces cellules *Shh*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>+</sup> peuvent également se différencier à partir de cellules capsulaires (origine fœtale ou mésenchymateuse). Ces cellules *Shh*<sup>+</sup>, *Sf1*<sup>+</sup> sont capables de contribuer au cortex adulte mais également à la zone X, dérivée de la zone fœtale.

non pas de cellules surrénaliennes fœtales (n'exprimant pas Wt1 à E11.5 et E12.5) (Figure 15). Les auteurs ont tout de même identifié certaines cellules capsulaires n'exprimant pas Wt1, mais exprimant Gli1. Ces cellules pourraient constituer les cellules capsulaires dérivées des cellules fœtales (Figure 15).

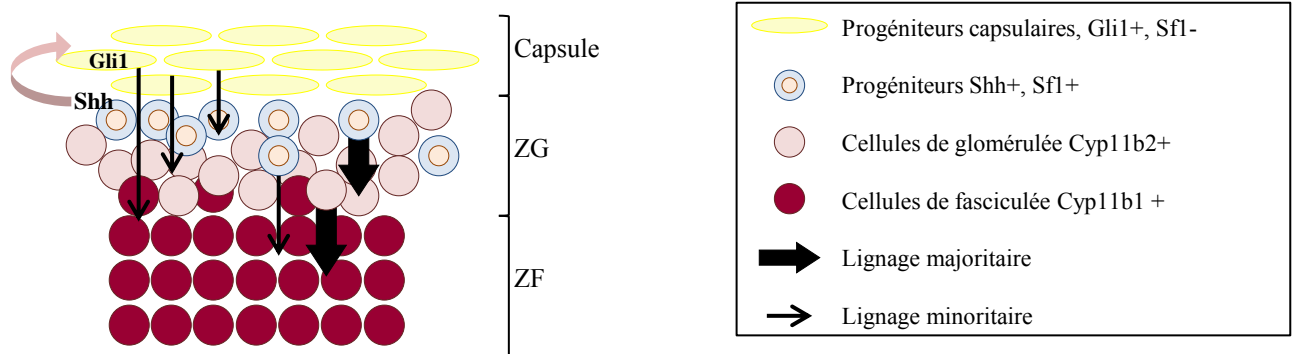
L'ensemble de ces résultats met en évidence plusieurs origines pour les cellules du cortex définitif ainsi que pour les cellules capsulaires (Figure 16). En effet, les cellules capsulaires semblent pouvoir provenir de cellules surrénaliennes fœtales (ayant utilisé le FAdE) (Wood et al., 2013) et de cellules mésenchymateuses (Bandiera et al., 2013). Les cellules surrénaliennes du cortex définitif ont en grande partie pour origine les cellules fœtales, qui devraient donc subir une transition du FAdE vers un enhancer adulte (Zubair et al., 2008). Mais les cellules surrénaliennes adultes peuvent également provenir de cellules capsulaires, soit d'origine fœtale soit d'origine mésenchymateuse (Bandiera et al., 2013; King et al., 2009; Wood et al., 2013).

## **B/ Maintien et renouvellement du cortex**

Le cortex surrénalien présente une capacité d'adaptation en fonction des besoins physiologiques. Les tailles des zones glomérulée et fasciculée peuvent être modulées en réponse au système rénine-angiotensine ou à l'axe hypothalamo-hypophysaire. En plus de ces remodelages de zones, le cortex est en renouvellement constant pour assurer son maintien au cours de la vie. Cette capacité d'adaptation et ce renouvellement repose sur des cellules progénitrices mobilisables et capables de régénérer l'ensemble des types cellulaires du cortex.

### **1. Les cellules progénitrices surrénaliennes**

La présence de cellules progénitrices dans la capsule surrénalienne a longtemps été supposée. Lors d'expériences d'énucléation de la surrénale (retrait de l'intérieur de la glande en laissant les cellules capsulaires et sous-capsulaires intactes), la régénération d'un cortex surrénalien avec une zonation correcte et des fonctions stéroïdogéniques normales, est observée 30 jours après l'énucléation (Perrone et al., 1986; Skelton, 1959). Ces premières expériences ont permis d'émettre l'hypothèse d'une population cellulaire capsulaire/sous-capsulaire capable de se différencier et de migrer de façon centripète (de la capsule vers la



**Figure 17 : Modèle de renouvellement et maintien du cortex surrénalien adulte.**

Le cortex surrénalien adulte est en renouvellement constant. Les cellules progénitrices stéroïdogènes et exprimant le ligand Shh (Sf1+, Shh+) participent à ce renouvellement. Ces cellules peu différenciées (Cyp11b2-, Cyp11b1-) ont la capacité de migrer de manière centripète au sein du cortex et de se différencier dans l'ensemble des types cellulaires du cortex. Dans un premier temps, les cellules Sf1+, Shh+ se différencient en cellules de glomérulée (Cyp11b2+). Ces cellules Cyp11b2+, en poursuivant leur migration, se localisent dans la zone fasciculée (ZF) et acquièrent l'identité de cette zone (Cyp11b1+). Les cellules progénitrices ont toutefois la capacité de se différencier directement en cellules de fasciculée. Le signal Shh émis par les cellules progénitrices sous-capsulaire est reçu par les cellules capsulaires Gli1+, Sf1-. Ces cellules peuvent participer au renouvellement du cortex, même si leur contribution semble relativement minoritaire. D'après King et al., 2008.

medulla) afin de régénérer le cortex surrénalien. Des analyses plus récentes ont permis de démontrer la localisation de ces cellules ainsi que leur identité moléculaire.

La première démonstration de l'origine capsulaire des cellules progénitrices a pu être établie par des expériences de lignage cellulaire reposant sur les acteurs de la voie Hh.

## 2. Signalisation Hh et progéniteurs surrénaliens

Dans la surrénale adulte comme au cours du développement embryonnaire, Shh est exprimé par des cellules exprimant également Sf1 en périphérie du cortex, dans une région proche de la zone glomérulée (Ching and Vilain, 2009; Huang et al., 2010; King et al., 2009). Toutefois ces cellules Shh+, Sf1+ n'expriment ni Cyp11b2 ni Cyp11b1. Ainsi les cellules exprimant le ligand Shh sont des cellules peu différenciées (King et al., 2009). Des expériences de lignage ont permis de démontrer que les cellules Shh ont la capacité de migrer de manière centripète au sein du cortex et de se différencier en cellules de glomérulée (Sf1+,Cyp11b2+) et de fasciculée (Sf1+, Cyp11b1+) (Figure 17), suggérant un modèle de différenciation séquentielle de glomérulée vers fasciculée (King et al., 2009). La preuve de ce modèle de différenciation a pu être apportée par un autre modèle de lignage où la recombinaison Cre est placée sous le contrôle du promoteur *Cyp11b2* (enzyme terminale de la synthèse d'aldostérone) et avec le système rapporteur mTmG au locus *ROSA26* (Freedman et al., 2013). Après cinq semaines, des cellules GFP+ sont détectées dans la zone fasciculée et expriment l'enzyme spécifique de cette zone, Cyp11b1. Le marquage de l'ensemble de la zone fasciculée est observé à douze semaines après la naissance. Ainsi les cellules Shh+, après avoir acquis une identité glomérulée, progressent à travers le cortex pour atteindre la zone fasciculée et acquérir l'identité de cette zone, par un mécanisme de trans-différenciation dont les modalités sont inconnues. Toutefois, la présence d'une zone fasciculée normale chez des souris qui ne développent pas de zone glomérulée suite à l'invalidation de Sf1 grâce à *Cyp11b2:Cre*, suggère que certaines cellules progénitrices ont la capacité de se différencier directement en cellules de la zone fasciculée (Freedman et al., 2013).

Chez l'adulte comme chez l'embryon, la sécrétion du ligand Shh est capable de stimuler des cellules capsulaires n'exprimant pas Sf1, mais qui expriment Gli1. Les études de lignage post-natal reposant sur les régions régulatrices de *Gli1* mettent en évidence une contribution des cellules Gli1+ à la formation de colonnes de cellules exprimant Sf1 et



Cyp11a1 dans l'ensemble du cortex (King et al., 2009). Ainsi les cellules capsulaires exprimant le facteur de transcription Gli1 ont la capacité de migrer au sein du cortex et de se différencier en cellules stéroïdogéniques, ce qui en fait également des progéniteurs surrénaliens (King et al., 2009). Toutefois, contrairement aux cellules Shh<sup>+</sup> elles ne semblent contribuer au renouvellement cellulaire que de manière très minoritaire (Figure 17).

L'utilisation de modèles génétiques d'inactivation de *Shh* dans les cellules stéroïdogènes exprimant Sf1, a permis de démontrer l'implication de la voie Hh dans le maintien et le renouvellement du cortex. La perte de *Shh* dans les cellules stéroïdogènes du cortex induit une réduction de la taille des surrénales avec un amincissement de la capsule (Huang et al., 2010; King et al., 2009), résultant d'une diminution de prolifération (Huang et al., 2010), alors que l'inactivation de Smo (indispensable à la signalisation Hh) dans les cellules stéroïdogènes n'a aucun effet sur la surrénale (King et al., 2009). Ceci indique que Shh est indispensable au renouvellement cortical et qu'il n'agit pas directement sur les cellules corticales mais plutôt sur les cellules capsulaires progénitrices qui expriment Gli1. Toutefois, compte-tenu de la faible contribution des cellules Gli1<sup>+</sup> au renouvellement cortical, il est peu probable que l'effet majeur de l'inactivation de *Shh* soit la seule conséquence de l'absence de recrutement des progéniteurs Gli1<sup>+</sup>. On peut donc supposer qu'indirectement, Shh participe à la production d'un signal par les cellules Gli1<sup>+</sup> (qui répondent à Hh) et que ce signal aurait la capacité de stimuler le trophisme des cellules corticales.

### 3. Contrôle de la signalisation Hedgehog dans le cortex

L'ensemble des données présentées ci-dessus montre le rôle essentiel de la voie Hh dans le renouvellement du cortex surrénalien. Celui-ci étant sans cesse soumis à des stimulations hormonales qui peuvent induire son remodelage, le contrôle de l'activité de la voie Hh semble essentiel afin de maintenir l'homéostasie cellulaire corticale.

Récemment, l'équipe de P. King s'est intéressée au rôle de la protéine Dlk1 (Delta like homologue 1 ou Pref1) dans le cortex surrénalien. Dlk1 est une protéine transmembranaire, initialement impliquée dans le contrôle de la différenciation des préadipocytes. Le clivage du domaine extracellulaire de Dlk1 par la TNF- $\alpha$ -converting enzyme produit un peptide soluble biologiquement actif (Wang and Sul, 2006). Celui-ci, par sa liaison avec la fibronectine,





induit l'activation de la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) aboutissant à la phosphorylation de Erk1-2 (Wang et al., 2010). Cette cascade de signalisation permet l'inhibition de la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures (Kim et al., 2007). Dans la surrénale, l'expression de *Dlk1* a été mise en évidence en périphérie du cortex et ses transcrits sont fortement accumulés dans la zone sous-capsulaire du cortex surrénalien de rat, pendant la régénération après énucléation (Simon and Hammer, 2012). L'étude de l'expression de *Dlk1* dans la surrénale montre que ce peptide se localise dans les mêmes cellules que *Shh* (Guasti et al., 2013). De plus, la forme soluble de *Dlk1* permet l'expression de *Gli1* dans les cellules capsulaires et ceci à travers un mécanisme dépendant de Erk1-2. Les auteurs montrent également que *in vitro* *Dlk1* a la capacité d'inhiber la transcription *Gli1* dépendante de *Shh*. *Dlk1* pourrait donc fonctionner comme un modulateur de la signalisation *Shh* dans les cellules capsulaires (Guasti et al., 2013).

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine constitue un autre candidat potentiel. Cette voie de signalisation essentielle au développement embryonnaire, dont le mode d'action et les mécanismes de contrôle seront discutés plus loin (chapitre V), repose sur les ligands extracellulaires Wnt (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family) qui permettent la stabilisation de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci est alors mobilisée dans le noyau où elle agit comme co-activateur transcriptionnel des facteurs LEF (Lymphoid Enhancer Factor)/TCF (T-Cell Factor). Les voies Wnt/ $\beta$ -caténine et Hh peuvent coopérer dans différents tissus, notamment au niveau de l'épithélium de la vessie pour la prolifération des cellules lors d'un processus de régénération (Shin et al., 2011). Dans la surrénale adulte, les cellules *Shh*<sup>+</sup> sont majoritairement des cellules présentant une activation de la voie  $\beta$ -caténine (Walczak et al., 2014). La  $\beta$ -caténine pourrait donc avoir un rôle dans l'homéostasie des progéniteurs. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse d'un modèle génétique présentant une perte partielle de la  $\beta$ -caténine dans les cellules stéroïdogènes. En effet, au cours du vieillissement de ces souris, une diminution de la taille du cortex est observée, suggérant une altération du renouvellement cellulaire du cortex (Kim et al., 2008a). À l'inverse, dans le modèle d'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans le cortex surrénalien, développé par l'équipe (souris  $\Delta$ Cat; Berthon et al., 2010), des cellules d'aspect fibroblastique n'exprimant pas *Sf1* s'accumulent dans le cortex des souris transgéniques. Ce phénotype s'accompagne également d'une augmentation de l'accumulation des transcrits *Shh* et *Gli1* (résultats non publiés, Annabel Berthon). L'ensemble de ces données laisse donc supposer que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pourrait, par son action sur l'expression de *Shh*, stimuler la prolifération et/ou



la survie des progéniteurs capsulaires et sous-capsulaires et donc assurer le maintien du cortex.

#### 4. Autres facteurs impliqués dans le recrutement des progéniteurs

Au cours du développement embryonnaire, une majorité de cellules capsulaires est dérivée de cellules mésenchymateuses exprimant *Wt1* (Bandiera et al., 2013). Dans les surrénales de souris adultes, *Wt1* est exprimé dans un petit nombre de cellules capsulaires, dans lesquelles il est coexprimé avec *Gli1* et *Pod1* (Bandiera et al., 2013). *Pod1* (ou *Tcf21*) est un facteur de transcription dont l'expression dans la surrénale, est restreinte aux cellules capsulaires (Kim et al., 2009). *Pod1* a la capacité d'interagir avec le promoteur de *Sf1* pour en inhiber la transcription (Cui et al., 2004; França et al., 2013; Tamura et al., 2001). De plus dans des souris invalidées pour *Pod1*, *Sf1* est présent dans les cellules capsulaires (Kim et al., 2009). L'expression de *Pod1* pourrait donc réprimer la transcription de *Sf1* pour maintenir ces cellules capsulaires indifférenciées. *Pod1*, comme *Gli1*, est donc un marqueur de cellules progénitrices surrénaliennes. Des analyses de ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation) ont montré que *Wt1* était recruté au niveau des promoteurs de *Gli1* et de *Pod1* (Bandiera et al., 2013). *Wt1* serait donc impliqué dans la régulation de l'expression de ces deux marqueurs de cellules progénitrices surrénaliennes. L'utilisation d'un modèle murin de lignage, dans lequel une Cre inducible est placée sous le contrôle du promoteur *Wt1* a permis de démontrer que ces cellules *Wt1*<sup>+</sup> ont la capacité de se différencier en cellules du cortex surrénalien chez les souris adultes (Bandiera et al., 2013). En conditions normales, elles ne contribuent toutefois au renouvellement que d'un faible nombre de cellules corticales. Ceci suggère que les cellules *Wt1*<sup>+</sup> pourraient correspondre aux cellules *Gli1*<sup>+</sup>. Effectivement, une majorité des cellules capsulaires qui exprime *Wt1* exprime aussi *Gli1*. Toutefois certaines cellules expriment uniquement soit *Wt1*, soit *Gli1* (Bandiera et al., 2013). Il semble donc qu'il existe au moins trois types moléculaires de cellules progénitrices capsulaires : des cellules *Gli1*<sup>+</sup> et *Wt1*<sup>+</sup>; des cellules *Gli1*<sup>-</sup> et *Wt1*<sup>+</sup>; des cellules *Gli1*<sup>+</sup> et *Wt1*<sup>-</sup> (Bandiera et al., 2013).



## 5. Conclusion

Le cortex surrénalien possède la capacité de se maintenir et de se renouveler au cours de la vie. Ce phénomène dépend d'une réserve de progéniteurs capsulaires et sous-capsulaires.

Les cellules sous-capsulaires Shh+, Sfl+ ont la capacité de se différencier en cellules de glomérulée et de fasciculée (King et al., 2009). Les mécanismes de régulation de cette différenciation ne sont pas identifiés. Toutefois les hormones trophiques de la cortico-surrénale (angiotensine II et ACTH) pourraient être impliquées dans le recrutement de ces progéniteurs. En effet, dans le modèle de lignage *Cyp11b2*-Cre ; mTmG, la perte des deux allèles de *Cyp11b2* induit une absence de sécrétion d'aldostérone conduisant à une augmentation de la rénine et donc de l'angiotensine II. Alors que le marquage GFP de l'ensemble de la zone fasciculée n'est observé qu'après douze semaines dans le cas d'une régulation normale du système rénine-angiotensine II, chez les souris invalidées pour *Cyp11b2*, l'augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine aboutit à un marquage total de la zone fasciculée en cinq semaines (Freedman et al., 2013). Ainsi, suite à une augmentation des concentrations circulantes d'angiotensine II, le renouvellement du cortex et donc le recrutement des progéniteurs sont fortement accélérés.

Les progéniteurs capsulaires Sfl- semblent présenter une certaine diversité ; ils peuvent être définis par leur expression différentielle des facteurs Gli1 et Wt1 (Bandiera et al., 2013). Ceci pourrait être expliqué par l'origine différente de ces cellules. En effet, les cellules Gli1+ Wt1+ et Gli1-Wt1+ seraient dérivées de cellules mésenchymateuses (Bandiera et al., 2013), alors que les cellules Gli1+ Wt1- pourraient se développer à partir de cellules surrénaliennes fœtales (Wood et al., 2013). Toutefois, l'ensemble de ces cellules progénitrices semble capable de se différencier en cellules stéroïdogéniques du cortex surrénalien. D'autres analyses devront être menées pour confirmer cette diversité et en comprendre les raisons. Ces observations posent la question des stimuli impliqués dans le recrutement de l'une et l'autre de ces populations. A ce titre, les travaux de Bandiera et al. ont permis de montrer que les cellules Wt1+ étaient particulièrement mobilisées en réponse à la castration. Il est toutefois encore difficile de comprendre la pertinence physiologique d'une telle observation, d'autant que les cellules mobilisées dans ces conditions acquièrent un phénotype plus proche des cellules de Leydig gonadiques que des cellules cortico-surrénaliennes (Bandiera et al., 2013). Il reste également à définir les mécanismes, probablement variables en fonction du type



cellulaire, qui permettent aux cellules progénitrices Sf1- d'acquérir ou de retrouver une identité stéroïdogénique.

## **D/ La zonation du cortex surrénalien**

La zonation du cortex surrénalien repose entre autre, sur l'expression différentielle des gènes des enzymes terminales de la stéroïdogénèse, *Cyp11b2* et *Cyp11b1* (Rainey, 1999). Chez la souris, l'expression de *Cyp11a1*, commune à toutes les zones, débute entre E11.5 et E12.5. *Cyp11b1*, spécifique de la zone fasciculée, est détecté à environ E13.5. *Cyp11b2*, pour la zone glomérulée, n'est exprimée qu'après la naissance (Laufer et al., 2012). Ainsi l'établissement d'une zonation fonctionnelle de la surrénale n'est achevée qu'en période périnatale. Elle doit ensuite être maintenue au cours du renouvellement cellulaire centripète, qui repose majoritairement sur une différenciation initiale en cellule de glomérulée puis de fasciculée. Les facteurs permettant aux cellules d'acquérir leur identité en fonction de leur position le long de l'axe capsule-medulla ne sont pas encore totalement connus. Toutefois certaines données permettent de supposer l'implication de certaines voies de signalisation.

### **1. La zone glomérulée**

L'aldostérone synthase ou *Cyp11b2* est essentielle à l'activité endocrine de la zone glomérulée (Freedman et al., 2013; Lee et al., 2005). Les acteurs impliqués dans le contrôle de son expression pourraient donc jouer un rôle important pour l'établissement d'une zone glomérulée fonctionnelle.

Dans des tissus adultes tels que le foie, les différents niveaux d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, résultant de gradients de ligands ou d'acteurs intracellulaires de la signalisation tels que APC (Adenomatous Polyposis Coli), sont les moteurs de la zonation métabolique (Benhamouche et al. 2006). Dans la surrénale, l'équipe a montré que l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans le cortex surrénalien chez les souris  $\Delta$ Cat est à l'origine d'une différenciation ectopique de cellules *Cyp11b2* + dans la zone fasciculée, associée à une hypersécrétion d'aldostérone (Berthon et al., 2010). A l'inverse, l'invalidation du gène *Wnt4* induit une perte d'expression de *Cyp11b2* (Heikkila et al., 2002). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine pourrait donc jouer un rôle dans l'établissement de l'identité glomérulée. Cette hypothèse est



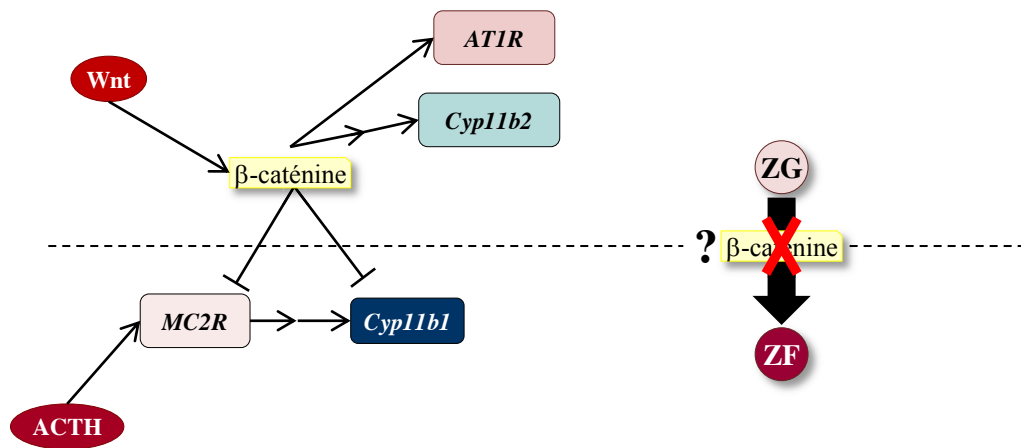


renforcée par la localisation des cellules dans lesquelles la voie de signalisation est active (localisation nucléo-cytoplasmique de la protéine  $\beta$ -caténine) en périphérie du cortex, plus particulièrement dans la zone glomérulée (Berthon et al., 2010; Kim et al., 2008a). Enfin, l'équipe a pu montrer que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine induit directement ou par l'intermédiaire des facteurs de transcription Nurr1 et Nur77, l'expression du récepteur à l'angiotensine II *AT1R* et de *Cyp11b2* (Berthon et al., 2014). La  $\beta$ -caténine permet donc l'établissement de la zone glomérulée en agissant positivement sur l'expression des acteurs essentiels à l'acquisition de son identité. En plus de favoriser l'acquisition de l'identité glomérulée, la  $\beta$ -caténine est capable d'agir comme un inhibiteur de l'identité fasciculée (Walczak et al., 2014). En effet, *in vitro* l'activation de la  $\beta$ -caténine dans des cellules cortico-surrénales murine ATC7-L (Adrenocortical Tumor Cells 7 Left) (Ragazzon et al., 2006) conduit à l'inhibition de l'expression du récepteur *MC2R* et de l'enzyme *Cyp11b1* dont l'expression est spécifique à la zone fasciculée (Walczak et al., 2014). Conformément à ces observations *in vitro*, les souris  $\Delta$ Cat présentent une diminution significative de l'expression de *Akr1b7* et de *Cyp11b1*, deux marqueurs de l'identité fasciculée (Berthon et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats montre le rôle essentiel de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'établissement de la zone glomérulée. Compte-tenu du mode de renouvellement cellulaire, reposant sur une différenciation séquentielle glomérulée puis fasciculée, ces résultats mettent en avant la nécessité d'inactiver la signalisation Wnt afin de permettre l'engagement dans le programme de différenciation fasciculée.

## 2. La zone fasciculée

L'identité fasciculée repose sur l'expression de l'enzyme terminale de la synthèse des glucocorticoïdes *Cyp11b1*, régulée par l'ACTH. L'expression du récepteur à l'ACTH *Mc2r* ainsi que celle des protéines accessoires *Mrap* ont été analysées dans le cortex surrénalien de rat par hybridation *in situ*. Ils sont exprimés dans l'ensemble du cortex mais moins fortement dans la zone glomérulée (Gorrigan et al., 2011). On peut donc s'attendre à ce que *Mc2r* et *Mrap* jouent un rôle critique dans la fasciculée mais pas dans la glomérulée. L'inactivation de *Mc2r* chez la souris conduit à une réduction de la taille des surrénales. La zone fasciculée est fortement atrophiée alors que histologiquement la zone glomérulée ne semble pas altérée (Chida et al., 2007). De plus, le traitement de souris avec un analogue des glucocorticoïdes, la



### **Figure 18 : Zonation du cortex surrénalien.**

Dans la cortico-surrénale, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est active dans les cellules de glomérulée. Elle permet l'expression des gènes spécifiques de cette zone, *Cyp11b2* et *AT1R*. A l'inverse, la  $\beta$ -caténine inhibe l'expression des gènes nécessaires à l'identité fasciculée, *MC2R* et *Cyp11b1*. La  $\beta$ -caténine est donc un acteur important de la différenciation glomérulée.

L'acquisition de l'identité fasciculée est dépendante de la signalisation ACTH, qui par l'intermédiaire de son récepteur MC2R et de la signalisation qui en découle, permet l'expression de *Cyp11b1*.

Lors du renouvellement du cortex surrénalien, les mécanismes permettant aux cellules de glomérulée (ZG) d'acquérir une identité de fasciculée (ZF) ne sont pas identifiés. Toutefois, la  $\beta$ -caténine étant un acteur majeur de la différenciation glomérulée et inhibant la différenciation fasciculée, un de ces mécanisme doit reposer sur son inhibition.

dexaméthasone qui bloque la libération d'ACTH par l'hypophyse, induit la perte des cellules de la zone fasciculée sans altérer les cellules de glomérulée (Freedman et al., 2013; Thomas et al., 2004). Ces résultats montrent donc que la signalisation ACTH est essentiellement active dans la zone fasciculée, dont elle induit la différenciation en permettant l'expression de *Cyp11b1*.

En conclusion, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, en permettant l'expression des acteurs de la zone glomérulée (*Cyp11b2* et *AT1R*) et en inhibant l'expression des gènes spécifiques de la fasciculée (*Cyp11b1* et *Mc2r*), induit une différenciation glomérulée, alors que l'acquisition de l'identité fasciculée est dépendante de la signalisation ACTH (Figure 18). Il reste maintenant à identifier les mécanismes à l'origine de la transition d'identité glomérulée vers fasciculée. On peut supposer que ceux-ci reposent, en partie, sur une inhibition de l'activité de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, dont les modalités restent à déterminer.



## IV. LES TUMEURS DE LA CORTICO-SURRENALE

Les tumeurs de la cortico-surrénales sont classées en deux catégories, les formes bénignes (adénomes ou hyperplasies) et les carcinomes malins. Ces tumeurs bénignes ou malignes peuvent être soit silencieuses (ne produisant pas d'hormones en excès), soit sécrétantes d'une ou plusieurs hormones cortico-surrénaliennes. Les tumeurs sécrétantes sont à l'origine de trois syndromes, selon l'hormone sécrétée en excès : syndrome de Cushing (excès de glucocorticoïdes), de Conn (excès d'aldostérone) et de virilisation (excès d'androgène). La majorité des tumeurs est non-sécrétante et bénigne (Latronico and Chrousos, 1997).

### **A/ Les tumeurs bénignes**

#### **1. Adénomes cortico-surrénaux**

La prévalence des adénomes cortico-surrénaux (ACS) est de 3 à 7% chez l'adulte de plus de 50 ans (Grumbach et al., 2003). Ils sont majoritairement non-sécrétants et unilatéraux. Environ 5% des ACS sont à l'origine d'une sécrétion de cortisol et entre 1 et 3% d'aldostérone (Boland et al., 2008; Mansmann et al., 2004).

##### ***a/ Adénomes producteurs de cortisol***

Ces tumeurs bénignes unilatérales sont la cause la plus fréquente des Cushing surrénaux (Lerario et al., 2014a). Le syndrome de Cushing est lié à un excès de cortisol. Une de ses principales manifestations cliniques est une surcharge adipeuse facio-tronculaire. La cause principale du syndrome de Cushing est iatrogène, liée à l'utilisation de glucocorticoïdes pour leurs actions anti-inflammatoires et immunosuppressives (Guaraldi and Salvatori, 2012). Le syndrome de Cushing endogène est causé par une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, conduisant à une production excessive de cortisol. Cette sécrétion trop élevée de cortisol est soit dépendante de l'ACTH soit indépendante. Les syndromes de Cushing dépendant de l'ACTH sont les plus fréquents (80-85%) et sont causés par une sécrétion d'ACTH trop importante, liée à un adénome hypophysaire. Une petite proportion des Cushing dépendants de l'ACTH résulte d'une sécrétion ectopique d'ACTH. Les syndromes de Cushing ACTH-indépendants, 15 à 20% des syndromes de Cushing, sont



causés par des tumeurs (adénomes ou carcinomes) ou des hyperplasies de la cortico-surrénale (Guaraldi and Salvatori, 2012).

Les mécanismes moléculaires à l'origine du développement des adénomes producteurs de cortisol ne sont pas totalement élucidés. Toutefois la signalisation AMPc/PKA étant impliquée dans la production de cortisol, une dérégulation de celle-ci peut expliquer une augmentation de l'activité endocrine. Des mutations de différents acteurs de la signalisation PKA ont été identifiées chez les patients, conduisant toutes à une augmentation de l'activité PKA. Ces mutations peuvent toucher les phosphodiesterases PDE8 et PDE11, la sous-unité régulatrice RI $\alpha$  de la PKA ou encore le gène codant la sous-unité G $\alpha$  de la protéine G associée à MC2R (Bertherat et al., 2003; Dall'Asta et al., 2004; Horvath et al., 2006, 2008). Toutefois la fréquence de ces mutations est assez faible. Récemment plusieurs équipes ont mis en évidence une mutation activatrice dans le gène *PRKACA*, codant la sous-unité catalytique C $\alpha$  de la PKA, dans 37% (22/59) (Beuschlein et al., 2014), 65,5% (57/87) (Cao et al., 2014), 35% (13/63) (Goh et al., 2014) et 52,3% (34/65) (Sato et al., 2014) des ACS producteurs de cortisol. Cette mutation induit la substitution d'une leucine en arginine en position 206 (L206R) (Beuschlein et al., 2014; Goh et al., 2014; Sato et al., 2014). La substitution L206R pourrait altérer l'interaction de la sous-unité catalytique avec la sous-unité régulatrice. Afin de valider cette hypothèse, des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées après expression de la forme mutante de C $\alpha$ , en culture cellulaire. Alors que Cao et ses collaborateurs n'ont pas montré de perte d'interaction C $\alpha$ /sous-unité régulatrice, celle-ci a été mise en évidence par les deux autres équipes ayant réalisé ces expériences (Cao et al., 2014; Goh et al., 2014; Sato et al., 2014). Dans tous les cas, une augmentation de l'activité de la PKA pouvant expliquer l'augmentation de l'activité endocrine de ces tumeurs a été démontrée. Toutefois, le rôle de l'augmentation d'activité de la voie PKA dans l'augmentation de prolifération à l'origine de la formation des adénomes est difficile à établir. En effet, les études sur l'action mitogène de la signalisation ACTH/PKA montrent alternativement des effets positifs (Lotfi and Armelin, 1998; Pignatelli et al., 2002) ou négatifs (Mattos et al., 2011) sur la prolifération, sans pour autant fournir d'explications à ces résultats contradictoires. Des études *in vivo* sont donc requises pour déterminer l'implication des mutations activatrices de la sous-unité C $\alpha$  dans le développement des adénomes cortisoliques.





### ***b/ Les adénomes producteurs d'aldostérone***

Les adénomes producteurs d'aldostérone (APA) sont la seconde cause d'hyperaldostéronisme primaire (Fagugli and Taglioni, 2011), ceux-ci étant majoritairement associés à des hyperplasies surrénaliennes. L'hyperaldostéronisme primaire est caractérisé par une production anormale d'aldostérone, d'origine surrénalienne, conduisant à une hypertension artérielle. Il s'agit de la principale cause d'hypertension secondaire avec une prévalence de 6 à 13% chez les patients hypertendus (Amar et al., 2010; Plouin et al., 2004). L'hypertension secondaire comme l'hypertension essentielle, est caractérisée par une augmentation de la pression artérielle. Toutefois, la forme essentielle ne présente pas de cause identifiée. Ainsi on définit une hypertension secondaire lorsqu'une étiologie telle qu'un adénome cortico-surrénalien ou une atteinte rénale, peut être déterminée (Carretero and Oparil, 2000; Chiong et al., 2008).

La recherche de mutations chez les patients souffrant d'APA a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans le développement de cette pathologie. Tout d'abord, des mutations ont été identifiées dans le gène *KCNJ5*, codant le canal potassique Kir3.4 (Boukroun et al., 2012; Choi et al., 2011). Des analyses *in vitro* ont permis de montrer que ces mutations sont à l'origine d'une perte de sélectivité de ces canaux pour le potassium (Choi et al., 2011). Ainsi les canaux laissent entrer du sodium entraînant une dépolarisation de la membrane, à l'origine de l'activation des canaux calciques. Ceci induit donc une entrée de calcium et la cascade de signalisation aboutissant à la transcription des enzymes de synthèse d'aldostérone. Ces mutations du gène *KCNJ5* sont retrouvées dans 34% des APA (129/380 APA) (Boukroun et al., 2012).

Des mutations ont également été identifiées dans les gènes codant des ATPases de type P *ATP1A1* et *ATP2B3* (Beuschlein et al., 2013). *ATP1A1* code une sous-unité  $\alpha$  (sous-unité catalytique) d'une ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (pompe sodium-potassium). L'hydrolyse d'ATP permet à *ATP1A1* l'échange de sodium cytoplasmique contre du potassium extracellulaire (Al-Salameh et al., 2014). Les analyses *in vitro* ont montré que les mutants du gène *ATP1A1* présentent une perte de l'activité de pompe et une réduction de l'affinité pour le potassium (Beuschlein et al., 2013). Cela entraîne une dépolarisation et donc une ouverture des canaux calciques. *ATP2B3* code pour une ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  (pompe calcique) essentielle à la sortie du calcium intracellulaire. *ATP2B3* joue donc un rôle important dans le contrôle de la concentration en calcium intracellulaire (Al-Salameh et al., 2014). Les prédictions informatiques suggèrent que les mutations touchant *ATP2B3* pourraient entraîner une



altération du site de liaison des ions calcium (Beuschlein et al., 2013). Ces mutations seraient donc à l'origine d'un défaut d'excrétion de calcium. Ainsi, les mutations touchant les gènes *ATP1A1* et *ATP2B3* entraînent une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, ceci conduisant à une stimulation de la synthèse d'aldostérone. Les mutations de *ATP1A1* et *ATP2B3* sont présentes respectivement dans 5.2% (16/380 APA) et 1.6% (5/380 APA) des APA (Beuschlein et al., 2013).

L'ensemble de ces mutations (KCNJ5, *ATP1A1* et *ATP2B3*) représentaient donc environ 40% des APA, mais les 60% restant n'avaient pas d'étiologie moléculaire connue. De plus, l'augmentation de prolifération à l'origine du développement des adénomes ne s'expliquait vraisemblablement pas par les mutations des canaux ioniques, celles-ci étant plutôt associées à une diminution de prolifération *in vitro* (Scholl et al., 2012). L'équipe a récemment mis en évidence une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans 70% des APA (33/47 APA) (Berthon et al., 2014). Cette activation de la  $\beta$ -caténine dans les APA est associée à une diminution de l'expression de *SFRP2* (Secreted Frizzled Related Protein) (Berthon et al., 2014), un inhibiteur de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine étant capable de réguler directement ou par l'intermédiaire des facteurs NUR1 et NUR77 la transcription de *AT1R* et *CYP11B2*, son activation entraîne donc une production accrue d'aldostérone (Berthon et al., 2014). L'équipe a également montré que l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine était capable de stimuler la prolifération cellulaire *in vivo* et de conduire à la formation de tumeurs productrices d'aldostérone (Berthon et al., 2010). On peut donc supposer que l'activation constitutive de la signalisation  $\beta$ -caténine, résultant d'une diminution de l'expression de *SFRP2*, pourrait conduire au développement d'une majorité d'APA. Il reste maintenant à déterminer l'existence d'interactions potentielles entre signalisation calcique/potassique et voie Wnt/ $\beta$ -caténine, pouvant conduire à une augmentation de prolifération chez les patients porteurs de mutations des canaux.

## 2. Les hyperplasies cortico-surréaliennes

### *a/ Les hyperplasies micronodulaires pigmentées*

Les hyperplasies micronodulaires pigmentées (Primary Pigmented Nodular Adrenal disease ou PPNAD) sont une forme rare d'hyperplasie cortico-surrénale bilatérale. Dans le PPNAD, les surrénales sont caractérisées par la présence de nombreux nodules foncés, à



l'origine d'un syndrome de Cushing ACTH indépendant (Horvath and Stratakis, 2007). Le PPNAD peut être retrouvé isolé, ou observé dans le cadre d'un syndrome multi-néoplasique, le complexe de Carney, dont il est la principale manifestation endocrine (Almeida and Stratakis, 2010). Le PPNAD sporadique ou dans le cadre du complexe de Carney a été associé à des mutations inactivatrices du gène *PRKARIA*, codant la sous-unité régulatrice RI $\alpha$  de la PKA (Groussin et al., 2002; Kirschner et al., 2000). Afin de démontrer l'implication de RI $\alpha$  dans le PPNAD, l'équipe a développé un modèle murin, les souris AdKO, invalidées pour cette sous-unité, spécifiquement dans la surrénale (Sahut-Barnola et al., 2010). Comme les patients, les souris AdKO développent un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH. Toutefois, cet hypercorticisme ne résulte pas du développement de micronodules, mais d'une hyperplasie consécutive à la résurgence de la zone X (zone fœtale). Celle-ci est liée à une augmentation de la survie cellulaire, expliquée en partie par l'activation de mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) (de Joussineau et al., 2014). Les cellules fœtales envahissent progressivement l'ensemble du cortex, induisant son atrophie. Les mécanismes induisant la régression du cortex chez ces animaux ne sont pas totalement élucidés mais pourraient aboutir à la sénescence des cellules corticales (de Joussineau et al., 2012). Même si la formation de nodules n'est pas observée chez les souris AdKO, l'équipe a pu montrer que les nodules des patients présentent également des caractéristiques fœtales telles que l'expression de l'Inhibine  $\alpha$  (Sahut-Barnola et al., 2010). L'ensemble de ces résultats met donc en évidence le caractère fœtal du PPNAD et démontre l'implication de mutations de *PRKARIA* dans le développement de ces tumeurs chez les patients. Ces mutations sont observées chez 80% des patients présentant un syndrome de Cushing dans le cadre du complexe de Carney (Cazabat et al., 2006). Des analyses génétiques ont montré que les 20% de cas restants pouvaient être causés par des mutations dans les gènes codant les phosphodiesterases *PDE8B* et *PDE11A*, également impliquées dans l'inhibition de la signalisation AMPc/PKA (Almeida and Stratakis, 2010).

#### ***b/ Hyperplasies macronodulaires bilatérales***

Les hyperplasies macronodulaires bilatérales représentent moins de 1% des syndromes de Cushing endogènes (Lacroix, 2009). Dans ces hyperplasies, une diminution de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse est observée (Antonini et al., 2006). L'hypercorticisme ne peut donc résulter d'une augmentation de l'activité de stéroïdogénèse par unité cellulaire. Il



semble plutôt causé par une augmentation importante du nombre de cellules stéroïdogènes (Lacroix, 2009).

Ces hyperplasies sont caractérisées par une expression anormale de récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, des récepteurs tels que le récepteur GIP (Gastric inhibitory polypeptide) normalement absent du cortex surrénalien, sont exprimés dans certaines de ces hyperplasies. Dans ce cas, la sécrétion de cortisol est dépendante de la prise alimentaire (Lacroix, 2009). D'autres récepteurs, comme le récepteur à la sérotonine ou les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques normalement présents dans le cortex, sont retrouvés surexprimés dans cette pathologie (Lacroix, 2009). Ces récepteurs ectopiques et eutopiques permettent la synthèse de cortisol en mimant la signalisation intracellulaire déclenchée par la liaison de l'ACTH à MC2R (Lacroix et al., 2010).

La nature bilatérale des hyperplasies macronodulaires suggérait l'existence d'une cause génétique sous-jacente. De récentes études de séquençage du génome entier de ces hyperplasies ont permis de mettre en évidence des mutations somatiques inactivatrices du gène *ARMC5* (*Armadillo repeat containing 5*) (Assié et al., 2013). L'analyse par séquençage direct a mis en évidence des mutations inactivatrices dans 18 patients sur 33 (55%) (Assié et al., 2013). *ARMC5* semble fonctionner comme un suppresseur de tumeurs classique. En effet, les altérations somatiques sont associées à des altérations germinales dans l'ensemble des patients testés (Assié et al., 2013). *In vitro*, l'inactivation de *ARMC5* par des siARN conduit à une diminution d'expression des enzymes de la stéroïdogénèse, comme chez les patients (Assié et al., 2013). La surexpression de la protéine *ARMC5* sauvage conduit à une apoptose cellulaire, alors que les formes mutantes trouvées chez les patients ont perdu cette capacité (Assié et al., 2013). Bien que les voies de signalisation mobilisées par *ARMC5* ne soient pas caractérisées, il semble donc impliqué dans le contrôle de la stéroïdogénèse et dans l'induction de la mort cellulaire. Compte-tenu de la présence de répétitions Armadillo dans la protéine *ARMC5*, comme dans la  $\beta$ -caténine, l'existence d'interactions entre ces deux voies devra être recherchée. De même, il serait intéressant d'analyser les associations potentielles entre mutations de *ARMC5* et expression ectopique de récepteurs couplés aux protéines G dans de plus larges cohortes de patients.

Jusqu'à présent, les hyperplasies macronodulaires bilatérales étaient considérées comme indépendantes de l'ACTH, car la production anormale de cortisol chez ces patients est associée à l'inhibition de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse. Ces hyperplasies étaient donc





nommées AIMAH (ACTH Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia). Des données récentes suggèrent que ces hyperplasies, bien qu'indépendantes de l'ACTH hypophysaire, sont dépendantes d'une production intra-surrénalienne de l'hormone corticotrope (Louiset et al., 2013). En effet, les auteurs détectent des ARNm POMC dans tous les échantillons d'hyperplasies macronodulaires analysées (26/26). Cette expression de *POMC* est associée à la présence d'ACTH dans des cellules sous-capsulaire du cortex et/ou dans les macronodules de tous les patients (25/25). Ces cellules ACTH positives expriment également l'enzyme prohormone convertase 1, qui permet de cliver la POMC en ACTH (Louiset et al., 2013). Des nodules de certains patients ont pu être mis en culture et traités avec les ligands des récepteurs ectopiques/eutopiques (GIP, sérotonine). Ceci induit une sécrétion d'ACTH et de cortisol (Louiset et al., 2013). Ainsi chez certains patients, la production de cortisol dans les hyperplasies macronodulaires semble à la fois contrôlée par des récepteurs ectopiques/eutopiques et par une production d'ACTH au niveau du cortex surrénalien (Louiset et al., 2013). Toutefois, l'accumulation des transcrits des enzymes de la stéroïdogénèse n'est pas augmentée dans les hyperplasies par rapport aux surrénales saines, alors même que l'ACTH est un puissant stimulateur de leur transcription (Louiset et al., 2013). Il reste donc à comprendre pourquoi cette production ectopique d'ACTH n'est pas associée à leur surexpression.

## **B/ Les carcinomes cortico-surréniens**

Les carcinomes cortico-surréniens (CCS) sont des tumeurs malignes rares avec une incidence de 0,5 à 2 nouveaux cas par an et par million chez l'adulte (Wajchenberg et al., 2000). Les CCS surviennent à tous les âges mais plus fréquemment entre 40 et 50 ans. Un pic d'incidence est également présent chez l'enfant (Latronico and Chrousos, 1997).

Ces tumeurs sont agressives avec 80% des patients développant des métastases (Gicquel et al., 1997a). Elles sont donc associées à un mauvais pronostic avec un taux de survie à 5 ans compris entre 15 et 44% (Abiven et al., 2006; Icard et al., 2001). Celui-ci dépend du stade de la tumeur au moment du diagnostic (Fay et al., 2014). La présentation clinique la plus fréquente est le syndrome d'hypersécrétion hormonale. Les CCS sont sécrétants dans 45 à 70% des cas et produisent en excès majoritairement du cortisol et/ou des androgènes et plus rarement de l'aldostérone (Else et al., 2014). La découverte des CCS non sécrétants se fait de manière fortuite, suite à un examen d'imagerie sans lien, ou suite à des

Critères histologiques	Poids du critère	
Grade nucléaire III ou IV <u>Grade III</u> : noyaux au contour irrégulier, diamètre de 20µm, nucléole apparent <u>Grade IV</u> : aspect proche du grade III, mais noyaux polylobés, chromatine hypercondensée	1	<p><b>Weiss ≤ 2 : tumeur bénigne</b></p> <p><b>Weiss ≥ 3 : tumeur maligne</b></p>
Mitoses > 6 pour 50 champs à fort grossissement	1	
Présence de mitoses atypiques	1	
Architecture diffuse	1	
Présence de nécrose	1	
Cellules claires ≤ 25%	1	
Invasion veineuse	1	
Invasion sinusoidale	1	
Infiltration capsulaire	1	

**Figure 19 : Score de Weiss.**

Score	Description
I	Tumeur localisée de moins de 5cm
II	Tumeur localisée de plus de 5cm
III	Quelle que soit la taille de la tumeur, présence de ganglions métastatiques et/ou d’une infiltration atteignant les organes de voisinage (tissu adipeux, veine cave, veine rénale)
IV	Quelle que soit la taille de la tumeur, présence de métastases à distance.

**Figure 20 : Classification ENSAT.**

douleurs abdominales. Au moment du diagnostic, les tumeurs sont généralement de tailles importantes, entre 10 et 13cm en moyenne, et la présence de métastases est détectée chez 25 à 30% des patients (Else et al., 2014).

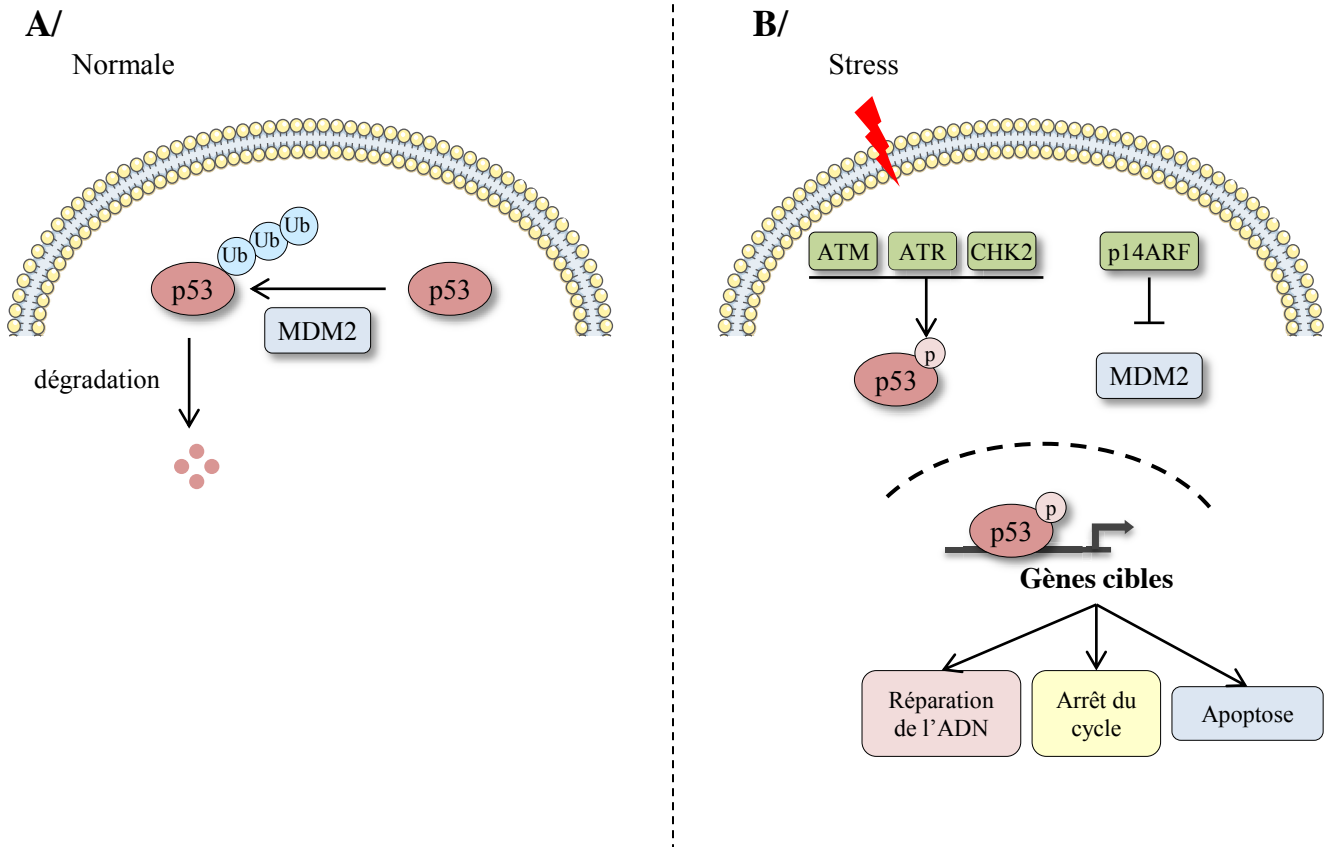
## 1. Diagnostic

L'analyse histologique de la tumeur permet de discriminer un CCS d'un ACS. Cette analyse repose sur le Score de Weiss (Figure 19). Ce score prend en compte 9 critères histologiques et la présence de 3 de ces critères ou plus, définit un CCS (Lau and Weiss, 2009). Toutefois une ambiguïté persiste pour des scores de 2 ou 3. D'autres analyses doivent donc être menées et notamment des analyses immunohistochimiques. Ainsi, l'analyse du marqueur de prolifération Ki67 peut permettre de distinguer un CCS d'une tumeur bénigne. Un index Ki67 supérieur à 5% n'est observé que dans les CCS. Toutefois certaines de ces tumeurs malignes présentent un index Ki67 plus faible, similaire à celui observé dans les ACS (Tissier, 2010). De plus une variabilité dans l'immunomarquage et le comptage existent entre les différents centres (Papotti et al., 2011). Toutefois, l'association de ce marquage avec l'évaluation du taux mitotique peut permettre un diagnostic dans les cas les moins évidents (Else et al., 2014)

Il existe également des critères pronostiques permettant de classer les CCS. La classification ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumours) de 2008 définit 4 stades reposant sur la taille de la tumeur et la présence de métastases (Figure 20) (Fassnacht et al., 2009). Ainsi, la survie spécifique à 5 ans est de 82% pour le stade I, 58% pour le stade II, 55% pour le stade III et 18% pour le stade IV. D'après les données d'une cohorte de plus de 400 patients, 14% des CCS sont détectés à un stade I, 45% à un stade II, 27% à un stade III et 24% à un stade IV (Else et al., 2014). L'index Ki67, outre son rôle dans le diagnostic, représente également un facteur pronostique. En effet, un index égal ou supérieur à 7% est associé à une diminution de la survie sans récurrence (Morimoto et al., 2008).

## 2. Traitements

Actuellement, l'exérèse complète de la tumeur primaire est le seul traitement curatif du CCS. Une thérapie adjuvante au mitotane peut être nécessaire. Le mitotane est un dérivé d'insecticide (le DichloroDiphenylTrichloroethane ou DDT) ayant un effet cytostatique sur les



**Figure 21 : Représentation schématique de la régulation de p53.**

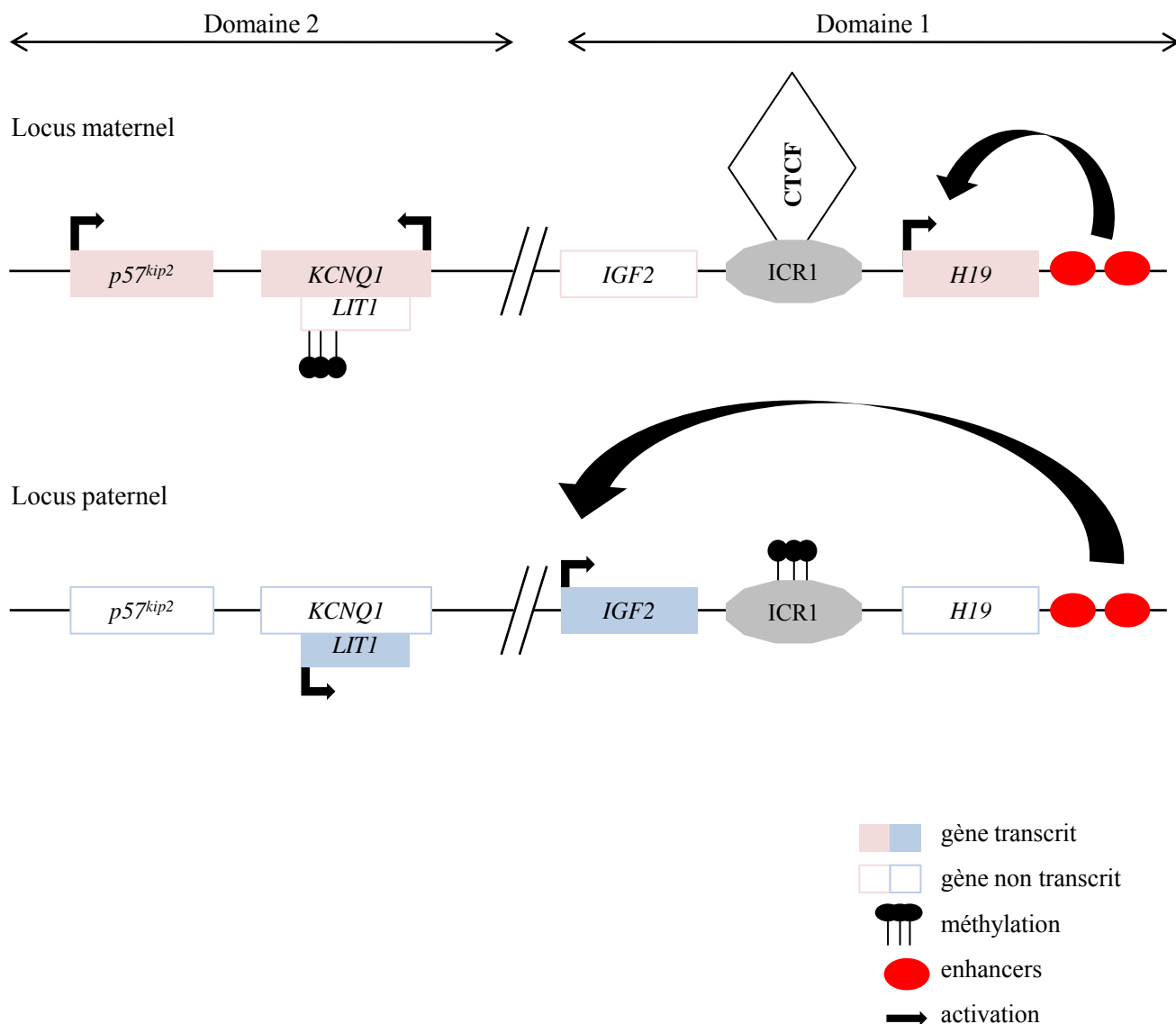
**A/** En condition normale, la protéine p53 est rapidement dégradée. Elle est donc présente en faible quantité dans la cellule. Ceci est assuré par l'ubiquitine E3 ligase MDM2, qui cible sa dégradation par le protéasome.

**B/** Lors d'un stress (lésions à l'ADN, hypoxie), des protéines médiatrices de ce signal de stress permettent la stabilisation de p53 par phosphorylation (ATM, ATR, CHK2) ou par inhibition de MDM2 (p14ARF). La protéine p53 stabilisée peut alors activer la transcription de ses gènes cibles impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose.

cellules cortico-surréaliennes. Ce composé est toxique pour les cellules du cortex surrénalien et inhibe la stéroïdogénèse (Hescot et al., 2013; Lin et al., 2012). Une étude rétrospective a démontré l'efficacité du mitotane sur la survie globale et sans récurrence des patients traités au mitotane après résection de la tumeur (Terzolo et al., 2007). L'efficacité de ce composé, nécessite d'obtenir une mitotanémie comprise entre 14 et 20 mg/L de plasma (Hermsen et al., 2011). Cependant le mitotane étant associé à de nombreux effets secondaires, notamment neurologiques et digestifs (Allolio and Fassnacht, 2006), il peut être difficile d'atteindre les seuils efficaces de mitotanémie. Pour les CCS métastatiques, le mitotane est également employé. Toutefois, le taux de réponse objectif n'est que de 24% (De Francia et al., 2012). Une stratégie thérapeutique utilisant une combinaison d'etoposide, doxorubicine, cisplatine et du mitotane peut être utilisée chez les patients ayant un CCS avancé, dont la mitotanémie n'a pas atteint une concentration suffisante (Fassnacht et al., 2011). Toutefois, une étude sur une large cohorte a montré que le taux de réponse objective n'est que de 23,2% (35/151) avec une survie globale de 14,8 mois et une survie sans progression de 5 mois (Fassnacht et al., 2012). Il est donc nécessaire d'identifier les altérations conduisant au développement des CCS, afin de pouvoir développer des thérapies plus efficaces.

### 3. Les altérations retrouvées dans les carcinomes cortico-surréaliens

Les CCS ont une origine monoclonale, suggérant l'apparition d'une altération initiale dans une cellule, aboutissant au développement d'un carcinome (Beuschlein et al., 1994; Gicquel et al., 1994). Les CCS peuvent survenir dans le cadre de syndromes héréditaires, tels que le syndrome de Li-Fraumeni (CCS chez 6.5 à 10% des patients atteints (Else, 2012)) ou le syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW, développement de CCS chez 5% des patients (Elliott et al., 1994)), suggérant l'implication de p53 et IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2) dans le processus de tumorigénèse. Différentes analyses moléculaires ont effectivement permis d'identifier des altérations dans le gène *TP53*, codant le suppresseur de tumeur p53, et des surexpressions du gène *IGF2*, codant le facteur de croissance IGF2, dans les CCS sporadiques.



**Figure 22: Organisation de la région génomique 11p15.5 (locus IGF2) chez l'Homme.**

La région 11p15 est soumise à empreinte parentale et se divise en deux domaines.

Dans le domaine 1, *IGF2* est exprimé à partir de l'allèle paternel alors que *H19* est exprimé à partir de l'allèle maternel. Ceci est dû à des différences de méthylation du centre d'empreinte (Imprinting control region ou ICR) de cette région. ICR1 n'est pas méthylé au locus maternel et recrute les protéines CCCTC binding factor (CTCF), bloquant l'action des enhancers sur *IGF2*. Au locus paternel, ICR1 est méthylé et ne lie pas CTCF. Les enhancers peuvent alors activer la transcription de *IGF2*.

Au niveau du domaine 2, le promoteur de *LIT1* (ou *KCNQ1OT1*) est méthylé au locus maternel, bloquant son expression, et les gènes *p57<sup>kip2</sup>* et *KCNQ1* s'expriment à partir de ce locus. Au locus paternel, *LIT1* s'exprime et réprime l'expression de *p57<sup>kip2</sup>* et *KCNQ1*. *p57<sup>kip2</sup>* code une protéine inhibitrice du cycle cellulaire. *KCNQ1* code un canal potassique.

### **a/ Perte de p53**

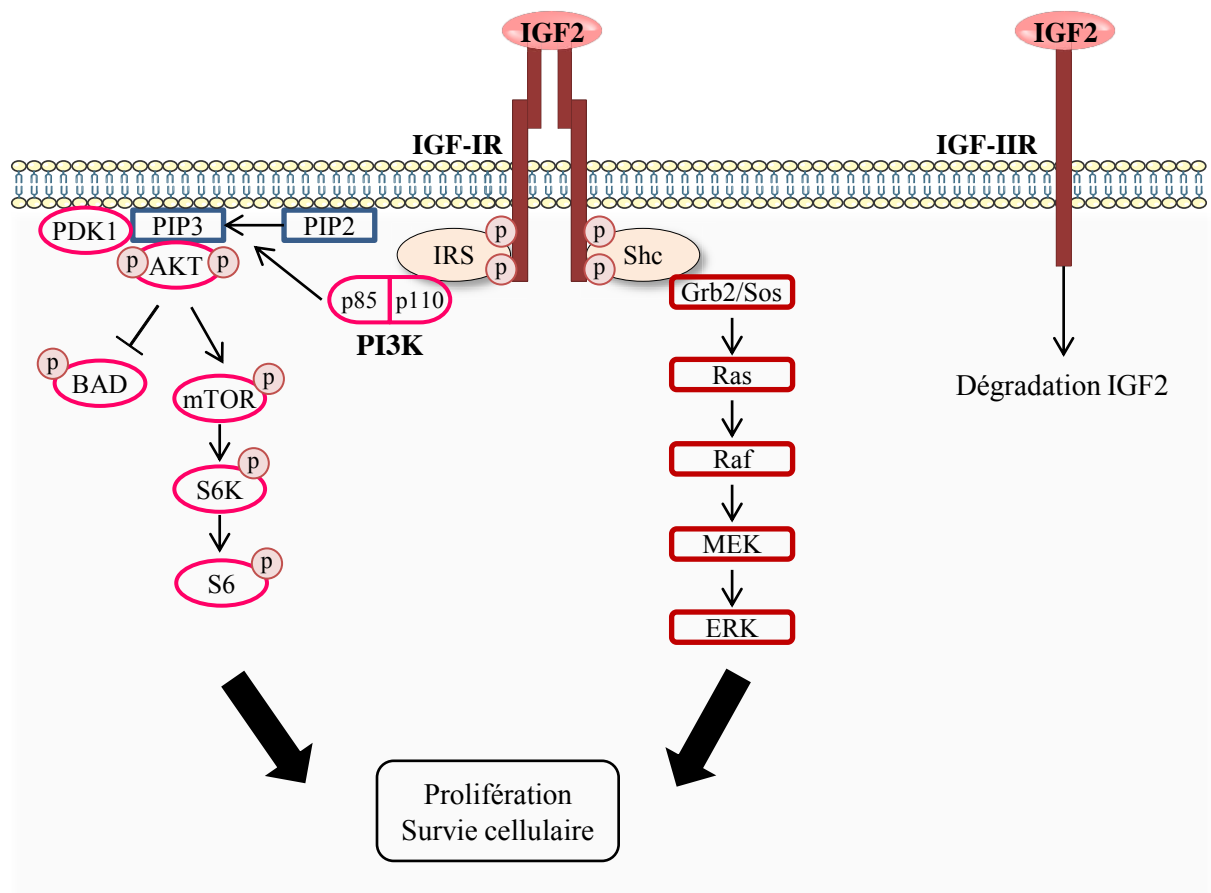
Le gène *TP53*, localisé au chromosome 17 (locus 17p13), code le suppresseur de tumeur p53. P53 est un facteur de transcription régulant un nombre très important de gènes permettant aux cellules de répondre à différents stress et altérations (Riley et al., 2008). Ainsi, p53 est un régulateur de nombreuses réponses cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence ou encore l'apoptose. En condition normale, la protéine p53 est présente en faible quantité et dispose d'une demi-vie courte. Cette régulation de p53 est assurée par une ubiquitine E3 ligase, MDM2 (Murine Double Minute 2 oncogene) (Figure 21A). MDM2 interagit avec p53 et permet sa translocation dans le cytoplasme (monoubiquitination) ou sa dégradation par le protéasome (polyubiquitination) (Lee and Gu, 2010). Lors de dommages cellulaires ou après des lésions de l'ADN, p53 est stabilisé par phosphorylation ou inhibition de MDM2 (Figure 21B). p53 peut alors activer la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans différents processus cellulaires comme la réparation de l'ADN ou l'apoptose (Riley et al., 2008).

Une perte d'hétérozygotie au locus 17p13 est observée dans plus de 80% des CCS sporadiques mais dans moins de 15% des ACS (Gicquel et al., 2001; Soon et al., 2008). Toutefois, seulement 33% de ces CCS présentant une perte d'hétérozygotie au locus 17p13 sont touchés par une mutation du gène *TP53* (Libe et al., 2007). Dans l'ensemble des CCS, les mutations du gène *TP53* sont retrouvées dans environ 16% de ces tumeurs (Assié et al., 2014; Ragazzon et al., 2010). Des analyses transcriptomiques ont permis de mettre en évidence une association entre les mutations *TP53* et un sous-type de CCS agressifs (Ragazzon et al., 2010). Ainsi, les altérations touchant p53 sont plutôt associées à des stades avancés et à un mauvais pronostic. Ces données suggèrent que p53 n'est pas un acteur majeur de l'initiation de la tumorigenèse cortico-surrénalienne mais qu'il agirait plutôt pour favoriser la progression et l'agressivité de ces tumeurs.

### **b/ Surexpression de IGF2**

La région génique (11p15.5) contenant le gène *IGF2* est une région soumise à l'empreinte parentale (Figure 22). L'empreinte parentale est un mécanisme par lequel certains gènes sont exprimés à partir d'un seul des deux allèles, en fonction de son origine parentale. La région génomique 11p15.5 se divise en deux domaines contenant les gènes *IGF2*, *H19* (code un ARN non traduit), *KCNQ1* (code un canal potassique), *LIT1* (code un long ARN





**Figure 23: Voie de signalisation de IGF2.**

IGF2 est un facteur de croissance pouvant se lier à deux récepteurs, IGFIR et IGFIIIR.

**IGFIR** est un récepteur tyrosine kinase. La liaison de IGF2 à ce récepteur induit l'autophosphorylation de la partie cytoplasmique du récepteur. Les résidus phosphorylés recrutent des protéines adaptatrices, IRS et Shc à leur tour phosphorylées. IRS recrute PI3K (p85/p110). PI3K convertit PIP2 en PIP3. PIP3 interagit avec PDK1 et AKT. Cette co-localisation permet à PDK1 de phosphoryler et d'activer AKT. AKT agit sur de nombreuses cibles pour favoriser la prolifération et inhiber l'apoptose.

Shc va permettre le recrutement d'autres protéines adaptatrices, Grb2/SOS qui vont activer Ras. Ras va permettre l'activation de la voie MAP Kinase, impliquée dans la prolifération.

**IGFIIIR** est un récepteur sans activité kinase. La liaison de IGF2 à ce récepteur induit sa dégradation par les lysosomes.

Noms	Fonctions
IGFBP-1	En concentration physiologique, stimule l'action de IGF1; en excès, inhibe les activités mitogènes de IGF1 et IGF2
IGFBP-2	Effets stimulateurs sur la signalisation IGF mais aussi un effet inhibiteur sur la synthèse d'ADN induite par IGF2
IGFBP-3	Transporteur principal des IGF dans le sérum; potentialise les activités des IGF mais en excès peu avoir un effet inhibiteur.
IGFBP-4	Inhibe l'action de IGF1
IGFBP-5	Inhibe l'action de IGF1; peut s'associer à la matrice extracellulaire, ce qui diminue son affinité pour les IGF et donc peut permettre d'augmenter l'activité de la voie.
IGFBP-6	Lie plus particulièrement IGF2.

**Figure 24: Les fonctions des IGFBPs.**

Les IGFBPs modulent l'action de IGF2. Six IGFBPs ont été identifiés. En se liant à IGF2, les IGFBPs peuvent augmenter la demi-vie de IGF2 ou diminuer sa disponibilité pour les récepteurs. Les IGFBPs peuvent également être associés avec la matrice extracellulaire et la surface cellulaire, augmentant ou limitant la liaison de IGF2 aux récepteurs. D'après Chao and D'Armour 2008.

non-codant) et *P57<sup>Kip2</sup>* (code une protéine inhibitrice du cycle cellulaire). L'expression de ces gènes dépend de l'origine parentale des allèles. Ainsi *IGF2* et *LIT1* sont exprimés à partir de l'allèle paternel alors que *H19*, *KCNQ1* et *P57<sup>Kip2</sup>* sont exprimés à partir de l'allèle maternel. Cette régulation de l'expression résulte de méthylations différentielles des centres d'empreinte (Imprinting Control Region ou ICR) (Biliya and Bulla, 2010).

Chez l'Homme et la souris, IGF2 est exprimé dans la plupart des tissus au cours du développement puis son expression est réprimée rapidement après la naissance. Elle persiste dans le foie adulte et dans le plexus choroïde chez l'Homme et dans les tissus entourant le système nerveux central chez la souris (Engström et al., 1998). Dans la surrénale, au cours du développement, IGF2 est plus fortement exprimé dans l'ensemble du cortex alors que IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) est restreint à la capsule (Else et al., 2014). L'expression de IGF2 diminue dans la surrénale adulte (Walczak and Hammer, 2014). Ainsi IGF2 agit plutôt sur le développement et la croissance fœtale, alors que IGF1 agit principalement en postnatal.

IGF2 est un facteur de croissance impliqué dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Maki, 2010). La signalisation IGF2 passe par un récepteur tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'insuline, IGF-IR (Insulin-like Growth Factor I Receptor) (Figure 23). Outre IGF2, IGF-IR est également capable de lier IGF1. La liaison du ligand à IGF-IR induit le changement de conformation du récepteur, son autophosphorylation et le recrutement des protéines IRS (Insulin Receptor Substrat) et Shc. La phosphorylation de ces protéines par le récepteur permet le recrutement de Grb2/SOS et de PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), conduisant à l'activation des voies MAPK et PI3K/AKT (Samani et al., 2007). Les activités biologiques de IGF2 sont modulées par l'association avec des protéines comme IGF-IIR (Insulin-like Growth Factor II Receptor) ou par les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein). IGF-IIR est un récepteur transmembranaire qui intervient dans l'internalisation et la dégradation de IGF2, permettant donc la régulation de la concentration de IGF2 circulant (Hassan, 2003). Comme *IGF2*, *IGF-IIR* est un gène soumis à l'empreinte. Cependant à l'inverse de *IGF2*, *IGF-IIR* est préférentiellement exprimé à partir de l'allèle maternel (Bergman et al., 2013). Six IGFBP ont été identifiés, chacun liant les IGF1 et 2 avec une affinité plus importante que IGF-IR. Chaque IGFBP présente un profil d'expression et des activités de modulation des IGF1 et 2 distincts (Figure 24). Les IGFBP sont donc d'importants modulateurs de l'action et de la disponibilité de IGF1 et de IGF2 (Chao and D'Amore, 2008; Clemmons, 1997).



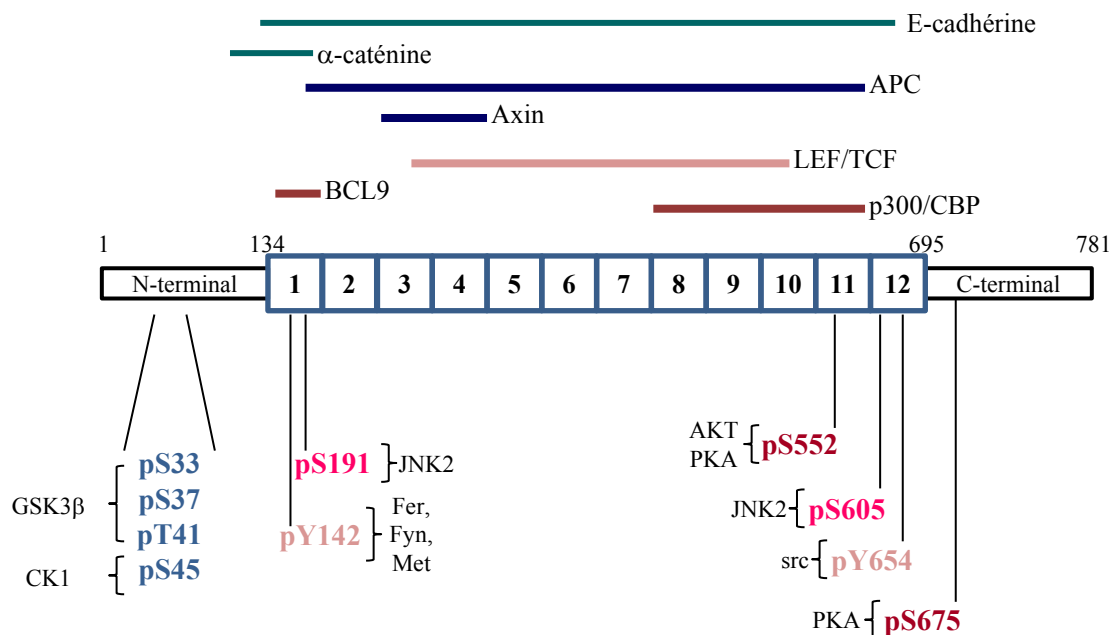
L'analyse des profils d'expression génique dans les tumeurs cortico-surrénaliennes a montré que *IGF2* était surexprimé dans 80 à 90% des CCS sporadiques (Gicquel et al., 1997b; Giordano et al., 2003) mais dans moins de 10% des ACS (Gicquel et al., 1997b). Cela fait de *IGF2* un excellent marqueur de diagnostic des CCS (Soon et al., 2009a). Cette surexpression de *IGF2* dans les CCS sporadiques est causée par une perte de l'allèle maternel avec duplication de l'allèle paternel (unidisomie uniparentale paternelle), mais aussi par des modifications du profil d'empreinte (Gicquel et al., 1997b; Ragazzon et al., 2011). Outre *IGF2*, d'autres composants du système IGF peuvent être altérés dans les tumeurs cortico-surrénaliennes. *IGF-IR* est ainsi retrouvé surexprimé dans les CCS (Weber et al., 1997). A l'inverse, une perte d'hétérozygotie est observée au locus *IGF-IIR* dans les tumeurs cortico-surrénaliennes. Cette altération est présente dans 58% des CCS analysés, contre 9% des tumeurs bénignes (Leboulleux et al., 2001). Une accumulation plus importante de la protéine IGFBP2 est également retrouvée dans les CCS, sans augmentation des transcrits *IGFBP2*, suggérant une régulation post-traductionnelle (Boulle et al., 1998). Les conséquences d'une augmentation de IGFBP2 ont été analysées *in vitro*. Dans des cellules tumorales cortico-surrénaliennes murines Y1, une surexpression de IGFBP2 entraîne une augmentation de la prolifération et de la clonogénicité de ces cellules (Hoeflich et al., 2000). Ainsi *IGF2* et d'autres acteurs de la signalisation IGF sont altérés dans les CCS, suggérant un rôle de cette voie de signalisation dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Conformément à cette hypothèse, des antagonistes de *IGF-IR* induisent une diminution de la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes humaines H295R en culture et en xénogreffes (Barlaskar et al., 2009).

Le SBW est un syndrome de surcroissance embryonnaire caractérisé par des remaniements chromosomiques et des modifications d'empreinte parentale au locus 11p15.5 à l'origine de la surexpression de *IGF2*. Des modèles animaux ont été développés pour reproduire une surexpression de *IGF2*, afin de comprendre son implication dans le SBW. Des souris transgéniques ayant intégré un transgène permettant une surexpression de *Igf2*, sous le contrôle de ses propres régions régulatrices (augmentation de 2 à 3 fois) présentent de nombreuses altérations retrouvées dans le SBW (Sun et al., 1997). Toutefois ces souris ne développent pas de tumeurs. Dans un modèle murin présentant une inactivation de *H19* (permettant une expression bi-allélique de *Igf2*) et une inactivation de *Igf-IIR*, les taux de *Igf2* dans les tissus sont 7 fois plus élevés (Eggenchwiler et al., 1997). Ces animaux présentent la plupart des caractéristiques du SBW, mais ne survivent pas au delà de E17.5 et l'apparition de



tumeurs n'a pas été montrée (Eggenschwiler et al., 1997). Un autre modèle de surexpression de IGF2 a été établi, dans lequel l'ADNc humain de IGF2 est placé sous le contrôle du promoteur du gène *Pepck*. Ces souris présentent une augmentation du poids des surrénales avec une hyperplasie de la zone fasciculée, mais ne développent pas de tumeurs (Weber et al., 1999). L'ensemble de ces résultats suggère que la surexpression de IGF2 n'est pas un événement initiateur, mais qu'elle pourrait participer à la progression tumorale cortico-surrénalienne en présence d'autres altérations.

En conclusion, l'inactivation de p53 et la surexpression de IGF2, retrouvées dans les CCS ne semblent pas initier le développement tumoral cortico-surrénalien. D'autres altérations doivent donc être à l'origine du développement de ces tumeurs. L'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, mise en évidence chez les patients présentant des tumeurs cortico-surrénaliennes bénignes et malignes (Bonnet et al., 2011; Gaujoux et al., 2011; Tissier et al., 2005) pourrait être un des facteurs déclenchant de la tumorigenèse dans la surrénale.



#### Dégradation

Perte de liaison à la α-caténine et E-cadhérine

Favorisent le transport nucléaire

Augmentent l'activité transcriptionnelle

**Figure 25: Représentation schématique de la β-caténine, de ses sites d'interaction et de phosphorylations.**

La β-caténine est une protéine multifonctionnelle intervenant dans l'adhésion cellulaire et dans la voie Wnt canonique. Elle se compose d'un domaine N-terminal et C-terminal et de 12 répétitions Armadillo. La β-caténine interagit avec de nombreux partenaires, représentés sur le schéma par les traits colorés. Elle intervient dans l'adhésion cellulaire en interagissant avec la α-caténine et la E-cadhérine. La β-caténine est la cible de nombreuses phosphorylations. La phosphorylation de la tyrosines 142 par des tyrosines kinases (Fer, Fyn ou Met) induit la perte d'interaction avec la α-caténine. La phosphorylation de la tyrosine 654 par la kinase src provoque la perte de la liaison à la E-cadhérine. Ces deux phosphorylations (pY142 et pY654) sont donc impliquées dans le recrutement de la β-caténine membranaire afin qu'elle intervienne dans la voie Wnt canonique. Dans la signalisation Wnt canonique, la β-caténine cytoplasmique, en absence d'activation de la voie, est maintenue à un faible niveau par le complexe de destruction (APC, Axin, GSK3β, CK1 et WTX1). Au sein de ce complexe la β-caténine est phosphorylée sur sa sérine 45 (pS45) par CK1, permettant à GSK3β de phosphoryler les sérines 33 et 37 (pS33 et pS37) et la thréonine 41 (pT41). Ces phosphorylations induisent la dégradation de la β-caténine par le protéasome. D'autres phosphorylations peuvent moduler l'activité de la β-caténine. La phosphorylation des sérines 191 et 605 (pS191 et pS605) par JNK2 favorise la translocation nucléaire de la β-caténine. La kinase AKT peut également phosphoryler la β-caténine sur sa sérine 552 (pS552) augmentant l'activité de la β-caténine. La signalisation PKA induit la phosphorylation des sérines 552 et 675 (pS552 et pS675), stimulant l'activité transcriptionnelle de la β-caténine.

## V. LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/ $\beta$ -CATENINE

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est contrôlée par les ligands glycoprotéiques Wnt et repose sur l'activité de la  $\beta$ -caténine. Cette signalisation est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération ou la différenciation (MacDonald et al., 2009). Il existe trois voies de signalisation Wnt, deux voies non-canoniques (indépendantes de la  $\beta$ -caténine) et la voie canonique (Niehrs, 2012).

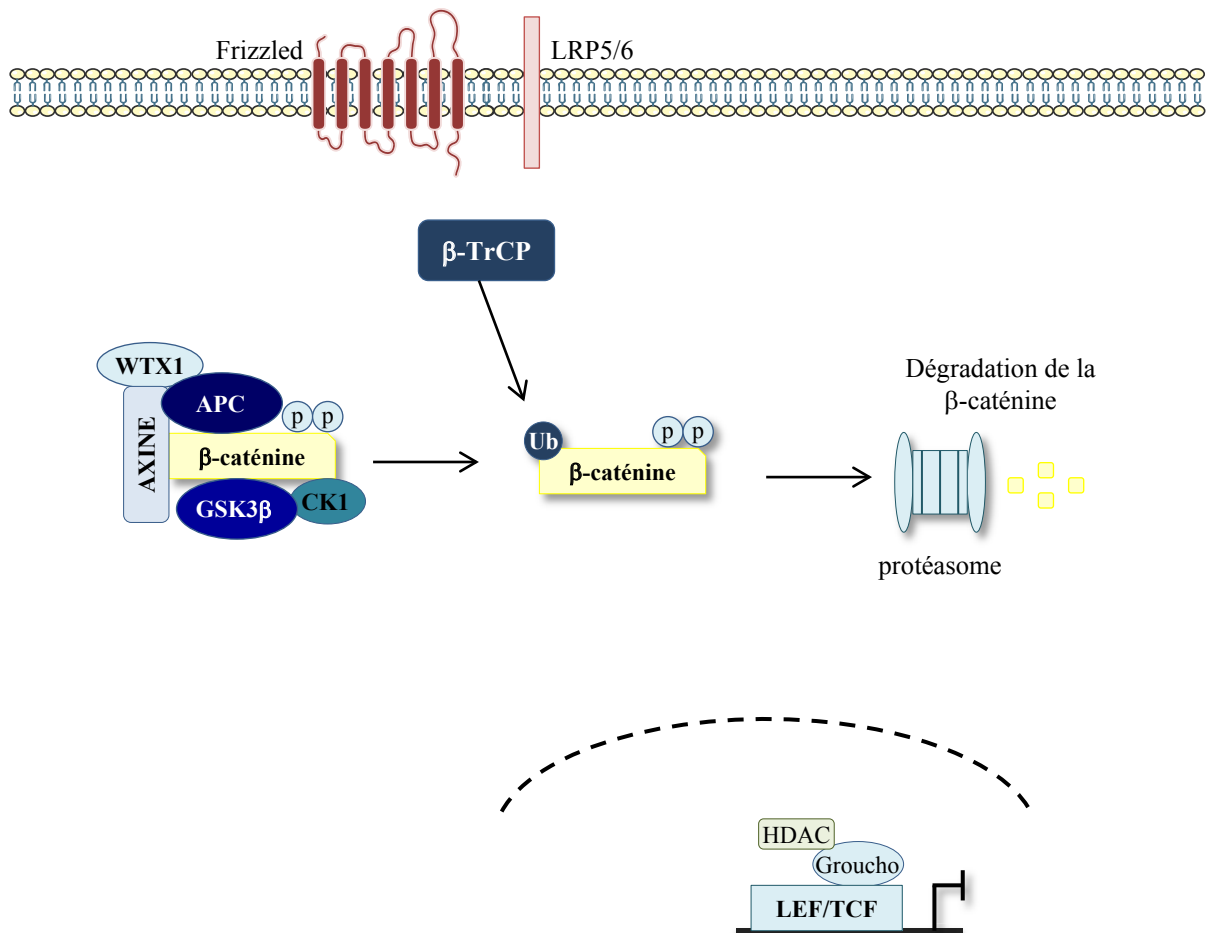
1) La voie de la polarité planaire cellulaire (Planar Cell Polarity ou PCP) est impliquée dans l'établissement de la polarité des cellules et notamment dans le processus d'extension convergence lors de la gastrulation (Gao, 2012). La voie PCP met en jeu les ligands Wnt, le récepteur Frizzled, des GTPases et la signalisation JNK (Jun N-terminal Kinase) pour le contrôle de la dynamique du cytosquelette et de la polarité (Gao, 2012).

2) La voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  est impliquée entre autres, dans la migration cellulaire et l'extension convergence. Au cours de la gastrulation et de la formation du tube neural, cette voie de signalisation agit en parallèle de la voie PCP, par sa capacité à activer des modulateurs d'actine (Clark et al., 2012).

3) La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine implique la stabilisation de la  $\beta$ -caténine et la régulation transcriptionnelle de ses gènes cibles. Cette voie de signalisation est également impliquée dans le développement embryonnaire et dans le renouvellement des tissus (Clevers, 2006). Des dérégulations de cette signalisation peuvent aboutir au développement de nombreux cancers (Polakis, 2000). Pour la suite, seule cette voie sera détaillée. En effet, parmi les voies de signalisation Wnt, la voie canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine est celle qui est le plus fréquemment impliquée dans le développement tumoral.

La  $\beta$ -caténine est une protéine multi-fonctionnelle, intervenant dans la signalisation Wnt canonique et dans l'adhésion cellulaire par interaction avec la E-cadherine et le cytosquelette d'actine. Elle contient un domaine central composé de 12 répétitions Armadillo, servant de plateforme d'interaction pour ses multiples partenaires (Figure 25) (Zhurinsky et al., 2000). Le domaine N-terminal de la  $\beta$ -caténine possède des sites multiples de phosphorylation permettant de réguler son activité, alors que le domaine C-terminal est un domaine transactivateur (Clevers and Nusse, 2012). Au vu de ses deux fonctions, la  $\beta$ -caténine est présente au niveau de la membrane plasmique dans les jonctions adhérentes mais





**Figure 26: La signalisation Wnt/β-caténine en absence de ligand Wnt.**

En absence de ligand, la β-caténine cytoplasmique est maintenue à un faible niveau grâce au complexe de destruction composé de GSK3β, CK1, APC, Axine et WTX1. Au sein de ce complexe, la β-caténine est phosphorylée sur sa sérine 45 par CK1, permettant la phosphorylation des sérines 33 et 37 et de la thréonine 41 par GSK3β. Ces phosphorylations permettent à l'ubiquitine E3 ligase β-TrCP de reconnaître la β-caténine et de cibler sa dégradation par le protéasome. L'absence d'accumulation de β-caténine limite sa translocation nucléaire. Dans ce contexte, les facteurs de transcription LEF/TCF, présents sur les promoteurs des gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine, sont associés aux répresseurs transcriptionnels de la famille Groucho, qui recrutent des HDAC.

également dans le cytoplasme et le noyau. Au niveau des jonctions adhérentes, la  $\beta$ -caténine interagit avec la  $\alpha$ -caténine et la E-cadhérine. Ce pool de  $\beta$ -caténine est relativement stable. A l'inverse, la  $\beta$ -caténine libre dans le cytoplasme est rapidement dégradée (Valenta et al., 2012). Des échanges entre ces deux réserves de  $\beta$ -caténine existent (Valenta et al., 2012). En effet des phosphorylations de certains résidus (tyrosines 142 et 654) ont été impliquées dans le recrutement de la  $\beta$ -caténine membranaire, afin qu'elle intervienne dans la voie canonique (Brembeck et al., 2006). La diminution d'expression de E-cadherine par siARN dans des cellules humaines de carcinome colorectal induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine, suggérant un relargage de la  $\beta$ -caténine de la membrane plasmique et sa mise à disposition pour l'activation transcriptionnelle. Cependant ceci n'est pas observé dans des cellules fibroblastiques (Kuphal and Behrens, 2006). Le recrutement de la  $\beta$ -caténine des jonctions adhérentes en réponse à la perte de la E-cadhérine pourrait donc dépendre du type cellulaire et probablement de l'activité du complexe de destruction (voir chapitre V.A/1.) (Kuphal and Behrens, 2006).

## **A/ Description de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine**

### **1. En absence de ligand Wnt**

En absence de ligand extracellulaire Wnt, le pool de  $\beta$ -caténine cytoplasmique est maintenu à un faible niveau grâce au complexe de destruction. Ce complexe se compose de deux serine/thréonine kinases GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) et CK1 (Casein Kinase 1) et de trois suppresseurs de tumeurs APC (adenomatous polyposis coli), Axine et WTX1 (Wilms Tumour gene on the X chromosome 1). L'axine sert de plateforme d'interaction, en interagissant avec la  $\beta$ -caténine et les autres acteurs du complexe (Clevers and Nusse, 2012). APC interagit avec la  $\beta$ -caténine et l'axine et est indispensable au fonctionnement du complexe de destruction, mais sa fonction dans celui-ci n'est pas encore complètement caractérisée (Clevers and Nusse, 2012). Au sein du complexe, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par CK1 sur sa sérine 45, permettant à GSK3 $\beta$  de phosphoryler les résidus serine 33, 37 et thréonine 41 localisés dans la partie N-terminale (Liu et al., 2002). Ces phosphorylations assurent la reconnaissance de la  $\beta$ -caténine par une ubiquitine E3 ligase, la  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -Transduction repeat Containing Protein) et sa dégradation par le protéasome (Figure 26) (Aberle et al., 1997). En limitant l'accumulation de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, cette



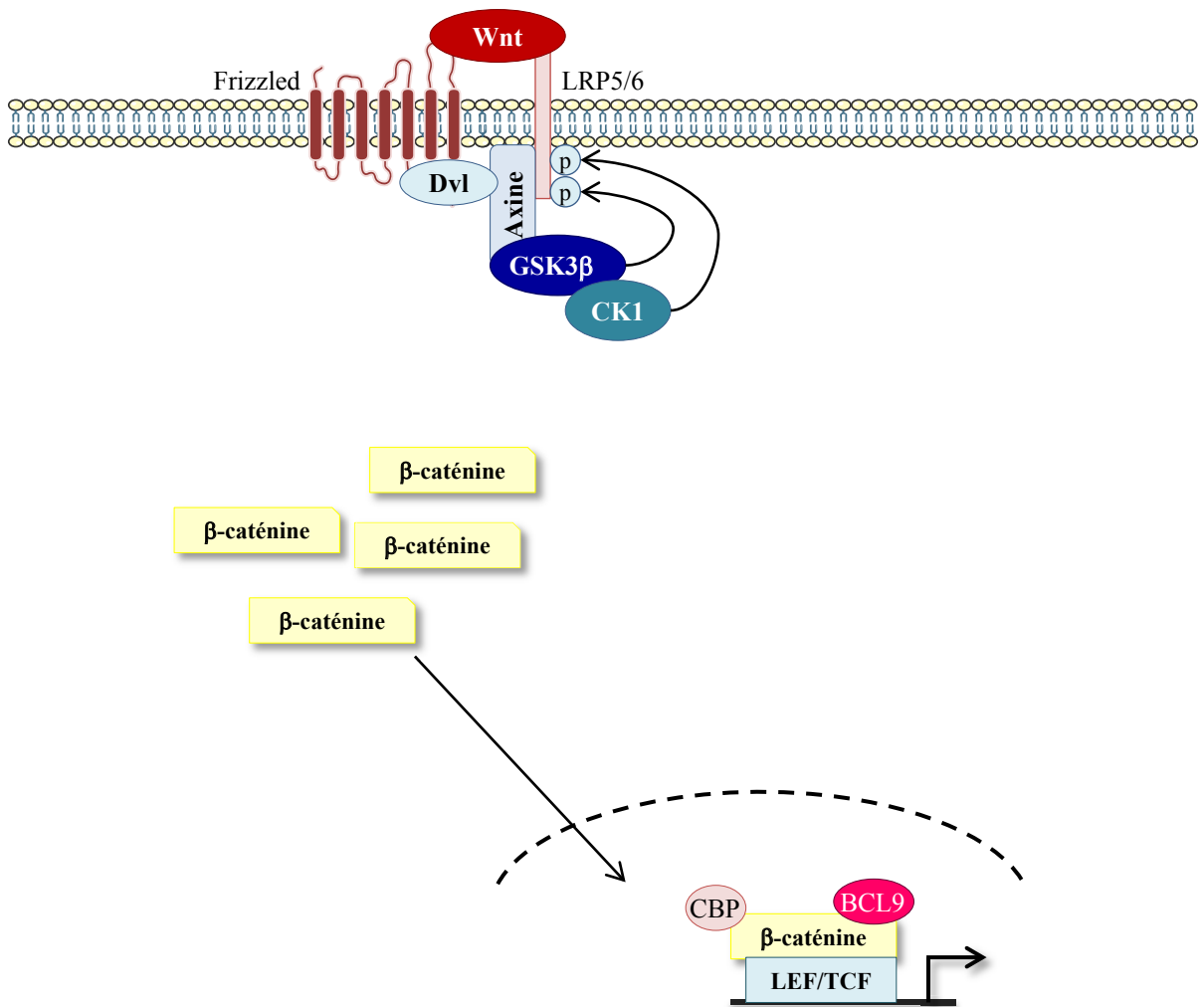
régulation limite la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et donc l'activation de la transcription de ses gènes cibles. Dans le noyau, les facteurs de transcription LEF et TCF sont présents sur les promoteurs des gènes cibles de la voie, mais sont associés aux répresseurs transcriptionnels de la famille Groucho/TLE (Transducin-Like Enhancer of split) qui recrutent des histones déacétylases (HDAC), conduisant donc à une répression transcriptionnelle des gènes (Figure 26) (Brantjes et al., 2001; Cavallo et al., 1998; Roose et al., 1998).

## 2. Activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine

L'activation de la voie est induite par la liaison du ligand sécrété Wnt au récepteur à sept domaines transmembranaires Fz (Frizzled) et au co-récepteur LRP5/6 (LDL-Receptor Protein 5/6).

### ***a/ Les ligands Wnt et les récepteurs Frizzled et LRP***

Dix neuf gènes codant les ligands Wnt ont été identifiés chez les mammifères (Miller, 2002). Les ligands Wnt sont des glycoprotéines sécrétées, pouvant subir des modifications post-traductionnelles (Kikuchi et al., 2011). Des résidus asparagines de Wnt3a et de Wnt5a sont glycosylés et des mutations de ces résidus, empêchant la glycosylation, sont à l'origine de défauts de sécrétion de ces ligands (Komekado et al., 2007; Kurayoshi et al., 2007). Néanmoins *in vitro*, les ligands dépourvus de glycosylation conservent leur capacité de signalisation (Komekado et al., 2007; Kurayoshi et al., 2007). Cette modification post-traductionnelle est donc nécessaire à la sécrétion mais pas à l'activité de ces ligands. Ces ligands sont également modifiés par ajout d'un acide palmitique sur un résidu cystéine (Kikuchi et al., 2011). La perte de cette modification induit des altérations dans la liaison des ligands à leurs récepteurs, notamment pour Wnt3a et Wnt5a (Kurayoshi et al., 2007; Takada et al., 2006; Willert et al., 2003). Les protéines Wnt ont d'abord été classées en deux catégories selon leur capacité à induire la stabilisation de la  $\beta$ -caténine : les Wnt canoniques et les Wnt non-canoniques. Ainsi la surexpression de Wnt1, Wnt3a et Wnt8 induit le développement d'un second axe dorso-ventral dans l'embryon de xénope, processus dépendant de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, et un changement de morphologie des cellules épithéliales mammaires de souris, accompagné de la stabilisation de la  $\beta$ -caténine, alors que les ligands Wnt5a et Wnt11 ne présentent pas ces effets (Du et al., 1995; Fagotto et al., 1997; Shimizu et



**Figure 27: La signalisation Wnt/β-caténine en présence du ligand Wnt.**

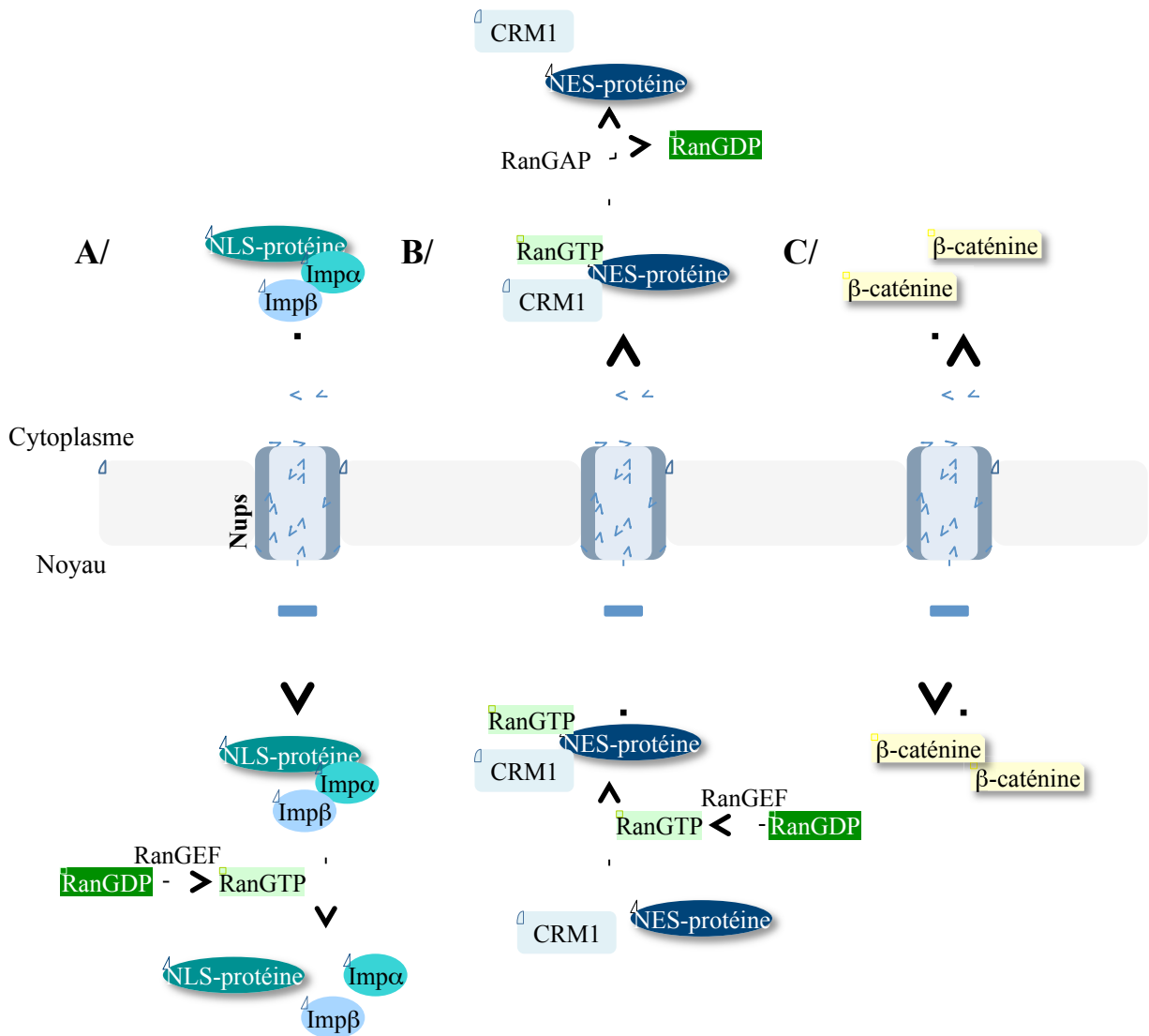
La liaison du ligand Wnt aux co-récepteurs LRP5/6 et Frizzled induit le recrutement de la protéine Dishevelled (Dvl) au domaine cytoplasmique de Frizzled. L'activation de la voie entraîne également la phosphorylation de la queue cytoplasmique de LRP5/6 par CK1 et GSK3β. Ceci induit le recrutement de l'axine à LRP5/6. Le complexe de destruction est alors séquestré à la membrane plasmique. La β-caténine, peut alors s'accumuler dans le cytoplasme et transloque dans le noyau. Là, elle interagit avec les facteurs de transcription LEF/TCF et recrute différents co-activateurs (CBP, BCL9) pour permettre la transcription de ses gènes cibles.

al., 1997). En revanche la surexpression de Wnt5a ou Wnt11 est associée au processus d'extension convergence lors de la gastrulation chez le xénope et le poisson zèbre, indépendamment de la  $\beta$ -caténine (Heisenberg et al., 2000; Wallingford et al., 2001). D'après ces données Wnt1, Wnt3a et Wnt8 seraient donc des ligands canoniques, alors que Wnt5a et Wnt11 seraient classés comme ligands non-canoniques. Toutefois d'autres études ont mis en évidence que certains Wnt agissent aussi bien en tant que ligands canoniques que non-canoniques et que l'action de ces ligands serait dépendante du récepteur. En effet, l'expression de Wnt5a ou Wnt11 fusionnés au récepteur Fz5 induit un second axe dans l'embryon de xénope et active un système rapporteur de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine dans des cellules de rein embryonnaire humain HEK-293T (Holmen et al., 2002). Ces résultats sont confirmés par une autre étude, où Wnt5a est capable d'activer la  $\beta$ -caténine en présence du récepteur Fz4 et de LRP5, en culture cellulaire (Mikels and Nusse, 2006). Ainsi les protéines Wnt pourraient agir sur les voies non-canoniques ou sur la voie canonique en fonction des récepteurs mis en jeu (van Amerongen et al., 2008).

Les ligands Wnt interagissent avec un récepteur hétérodimérique constitué d'un récepteur Fz et d'un co-récepteur LRP5/6. Dix gènes *Frizzled* sont présents chez les mammifères, codant les récepteurs Fz1 à Fz10 qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. La partie N-terminale extracellulaire contient un domaine riche en cystéine (Cysteine-Rich Domain ou CRD), permettant l'interaction avec les protéines Wnt (Bhanot et al., 1996; Dann et al., 2001). Dans la partie intracellulaire en C-terminal, les récepteurs Fz comportent un domaine PDZ permettant l'interaction avec d'autres protéines et notamment avec la protéine Dishevelled (Dvl) (Wong et al., 2003).

#### ***b/ Liaison du ligand aux récepteurs***

La liaison du ligand Wnt à ses récepteurs LRP5/6 et Fz déclenche une série de mécanismes moléculaires aboutissant à la déstabilisation et à l'inhibition du complexe de destruction (Figure 27). La formation de ce complexe permet le recrutement de la protéine Dvl au niveau du domaine cytoplasmique de Fz (Wong et al., 2003). L'activation de la voie passe par le recrutement de l'Axine au domaine cytoplasmique de LRP (Mao et al., 2001). Ceci nécessite la phosphorylation de certains résidus du domaine intracellulaire de LRP, effectuée par CK1 et GSK3 $\beta$  (Davidson et al., 2005; Zeng et al., 2005). Le complexe de destruction se retrouve ainsi séquestré au niveau de la membrane plasmique, par le



**Figure 28: Import et export nucléaire.**

A/ Dans le cytoplasme, les protéines possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) s'associent avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  (Imp $\alpha$  et Imp $\beta$ ). L'importine  $\beta$  permet le passage à travers le pore nucléaire par interaction avec les motif FG (répétitions d'acides aminés phénylalanine et glycine) des nucléoporines (Nups, les protéines constituant le pore nucléaire). Une fois dans le noyau, le complexe Protéine-Imp $\alpha$ -Imp $\beta$  se dissocie en présence de RanGTP.

B/ Dans le noyau, la protéine possédant un signal d'export nucléaire (NES) s'associe avec CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1, le récepteur d'export) en présence de RanGTP. CRM1, en interagissant avec les Nups, assure le transport de la protéine du noyau vers le cytoplasme. Le complexe se dissocie dans le cytoplasme où RanGTP est hydrolysé en RanGDP.

C/ La  $\beta$ -caténine étant dépourvu de NLS et NES, elle ne peut interagir avec les importines et exportine pour son transport nucléo-cytoplasmique. La  $\beta$ -caténine, par l'intermédiaire de certains de ses domaines Armadillo, interagit directement avec les motifs FG des protéines Nups du pore nucléaire, lui permettant de passer du cytoplasme vers le noyau et inversement.

RanGEF : Ran Guanine nucleotide Exchange Factor ; RanGAP : Ran GTPase Activating Protein.

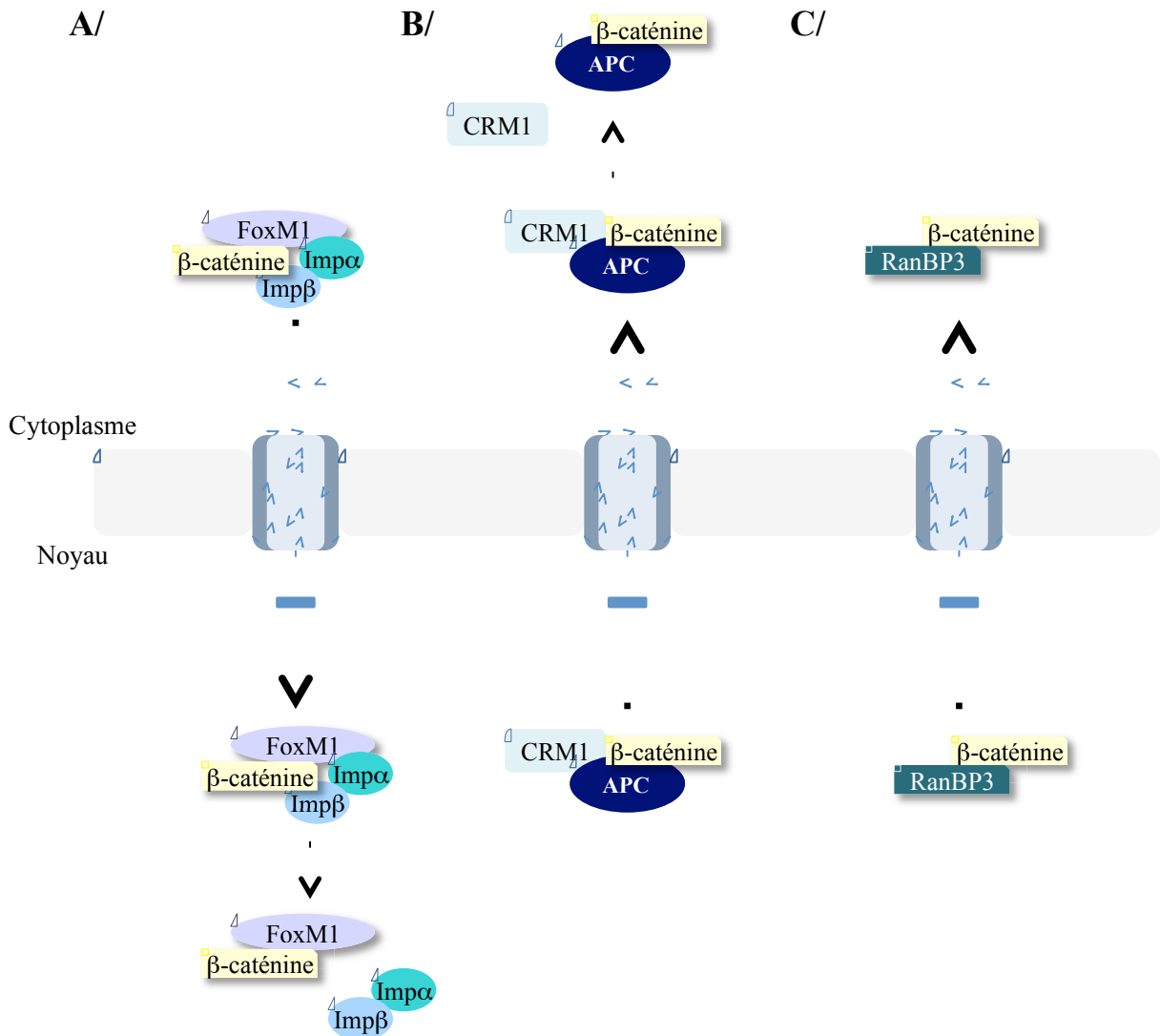
D'après Jamieson et al., 2014.

recrutement de l'Axine à LRP. La  $\beta$ -caténine n'est donc plus phosphorylée et dégradée, elle s'accumule dans le cytoplasme et peut entrer dans le compartiment nucléaire pour permettre l'expression de ses gènes cibles. D'autres modèles d'inactivation du complexe de destruction en réponse au ligand Wnt ont été décrits (Li et al., 2012). Il a été proposé que l'interaction de l'axine avec LRP conduise à sa dégradation (Tolwinski et al., 2003). La liaison des ligands Wnt pourrait également être à l'origine de l'inhibition de l'activité kinase de GSK3 $\beta$  (Taelman et al., 2010; Wu et al., 2009).

### *c/ Import et export nucléaire de la $\beta$ -caténine*

Une fois stabilisée, la  $\beta$ -caténine doit passer dans le noyau afin d'assurer la transcription de ses gènes cibles. L'import et l'export nucléaire de la plupart des molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 40KDa nécessite un transport actif assuré par des récepteurs de type importine et exportine (Figure 28). Toutefois, la  $\beta$ -caténine ne possédant pas de signal de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signal), elle ne peut se lier aux importines qui assurent normalement l'entrée des protéines au travers des pores nucléaires (Nuclear Pore Complexes ou NCP), composés de nucléoporines (Nups) (Jamieson et al., 2014). En effet, il a été démontré que la  $\beta$ -caténine, via certains de ses domaines Armadillo, interagit directement avec les motifs FG (répétitions d'acides aminés phénylalanine et glycine) des protéines Nups du NCP, lui permettant de passer d'un compartiment à l'autre (Figure 28) (Sharma et al., 2012). Ce transport semble modulé par des modifications post-traductionnelles de la  $\beta$ -caténine. Ainsi, Sharma et ses collaborateurs ont utilisé une  $\beta$ -caténine mutée pour la tyrosine 654 (Y654), présentant soit une mutation phospho-mimétique (Y654E), soit une mutation phospho-inactive (Y654P). Ces deux formes présentent un import nucléaire augmenté par rapport à la forme non-mutée (Sharma et al., 2012). Cette tyrosine doit donc jouer un rôle dans le contrôle du trafic nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine. La phosphorylation de ce résidu Y654 a également été impliquée *in vivo* dans l'augmentation de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (van Veelen et al., 2011). Toutefois, l'augmentation de l'accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine n'est réellement mise en évidence que lorsque *Apc* est également muté. Ainsi la  $\beta$ -caténine portant un résidu phospho-mimétique en position 654 se déplace plus facilement du cytoplasme vers le noyau. Toutefois ceci nécessite que le complexe de destruction soit altéré (van Veelen et al., 2011). La régulation du transport de la  $\beta$ -caténine peut aussi mettre en jeu la phosphorylation d'autres





**Figure 29: Import et export nucléaire de la  $\beta$ -caténine par certains de ses partenaires.**

**A/** FoxM1 possède un signal de localisation nucléaire lui permettant de d'entrer dans le noyau par le système des importines. FoxM1 est également capable d'interagir avec la  $\beta$ -caténine et de la transporter dans le noyau par ce mécanisme.

**B/** APC possède une séquence d'export nucléaire, lui permettant de sortir du noyau grâce au récepteur d'export CRM1. En s'associant à la  $\beta$ -caténine nucléaire, APC permet de l'exporter dans le cytoplasme.

**C/** La protéine RanBP3 peut se lier à la  $\beta$ -caténine et l'exporter hors du noyau par un mécanisme indépendant du CRM1.

résidus. En effet, la phosphorylation des sérines 191 et 605 de la  $\beta$ -caténine par JNK2, dont l'activation est induite par Wnt3a, peut aussi favoriser son transport nucléaire (Wu et al., 2008).

D'autres protéines peuvent intervenir dans le transport nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine. Ainsi, il a été démontré que, dans des cellules gliales humaines, le facteur de transcription FoxM1 (Forkhead box protein M1) permet l'entrée de la  $\beta$ -caténine dans le noyau, en réponse au ligand Wnt3a (Zhang et al., 2011). L'inhibition de FoxM1 par des shARN induit une diminution de l'accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. FoxM1 interagit directement avec les domaines Armadillo 11 et 12 de la  $\beta$ -caténine et son NLS est nécessaire au transport nucléaire du complexe FoxM1 et  $\beta$ -caténine (Figure 29A) (Zhang et al., 2011). D'autres facteurs, comme le récepteur des androgènes AR peuvent aussi permettre le transport nucléaire de la  $\beta$ -caténine (Mulholland et al., 2002). Dans ce contexte, le transport nucléaire de la  $\beta$ -caténine s'effectue par le système des transporteurs importines grâce à l'association à d'autres protéines présentant un NLS.

L'export de la  $\beta$ -caténine peut également mettre en jeu d'autres protéines telles que APC et RanBP3 (Ran Binding Protein 3). En effet APC possède des séquences d'import et d'export nucléaire lui permettant de naviguer entre le noyau et le cytoplasme grâce aux importines et au récepteur d'export CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) (Neufeld et al., 2000a; Zhang et al., 2000). Dans le noyau, APC est capable d'interagir avec la  $\beta$ -caténine et de l'exporter hors de ce compartiment grâce au CRM1 (Figure 29B) (Henderson, 2000; Neufeld et al., 2000b). RanBP3 interagit directement avec la  $\beta$ -caténine dont il stimule la sortie hors du noyau, indépendamment de CRM1 (Figure 29C) (Hendriksen et al., 2005). Son activité peut être modulée par des voies de signalisation telles que les voies PI3K/AKT et Ras/ERK (Yoon et al., 2008). Ceci pourrait permettre une modulation de l'activité de la  $\beta$ -caténine, en fonction du statut d'activation de ces voies.

En conclusion, la régulation du trafic nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine met donc en jeu de nombreux mécanismes et acteurs. Ces différents processus de transport sont probablement dépendants du type cellulaire et de l'expression des différents facteurs impliqués. Ces différents mécanismes pourraient assurer un niveau de régulation supplémentaire de l'activité de cette voie de signalisation.



#### *d/ Activités nucléaires de la $\beta$ -caténine*

Une fois dans le noyau, la  $\beta$ -caténine peut permettre la transcription des gènes cibles de la voie. Ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, la  $\beta$ -caténine interagit avec les facteurs de transcription LEF/TCF, associés aux promoteurs des gènes cibles. La liaison de la  $\beta$ -caténine à ces facteurs permet de déplacer les co-répresseurs Groucho associés à LEF/TCF en absence d'activation de la voie Wnt (Daniels and Weis, 2005). Associée à LEF/TCF, la  $\beta$ -caténine recrute alors différents co-activateurs tels que CBP/p300 et BCL9/Pygo pour permettre la transcription des gènes (Mosimann et al., 2009).

Les facteurs de transcription LEF/TCF sont les principaux partenaires de la  $\beta$ -caténine dans le noyau (Valenta et al., 2012). Cependant cette dernière peut interagir avec d'autres facteurs de transcription pour initier l'expression de gènes, notamment avec des récepteurs nucléaires. Ainsi, le récepteur des androgènes AR et le récepteur des rétinoïdes RAR ont été décrits comme des partenaires de la  $\beta$ -caténine dans le noyau (Easwaran et al., 1999; Mulholland et al., 2003). Cette interaction avec ces récepteurs nucléaires induit une compétition avec les facteurs de transcription LEF/TCF pour la  $\beta$ -caténine nucléaire et donc lors de l'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif, une diminution de la transcription des gènes dépendants de LEF/TCF est observée (Easwaran et al., 1999; Mulholland et al., 2002). Le récepteur nucléaire Sf1, essentiel au développement surrénalien et à la stéroïdogénèse, est également un partenaire de la  $\beta$ -caténine. En effet ces deux acteurs agissent en synergie pour la transcription de gènes cibles de Sf1 tels que *Inhibine  $\alpha$*  et *LH $\beta$*  (Luteinizing Hormone Beta) (Gummow et al., 2003; Salisbury et al., 2007). L'inhibition de Sf1 par ARN interférence dans des cellules H295R induit une augmentation de la transcription des gènes LEF/TCF dépendants *AXIN2* et *CCND2* (Ehrlund et al., 2012). Ces données laissent supposer que Sf1 agit comme les récepteurs nucléaires AR et RAR, en rentrant en compétition avec les facteurs LEF/TCF pour lier la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine peut également avoir un impact négatif sur l'expression de certains gènes Sf1 dépendants. En effet, dans des cellules ATC7L, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine conduit à une diminution de l'expression de plusieurs gènes cibles de Sf1 (*StAR*, *Cyp11a1*, *Mc2r*) (Walczak et al., 2014). Dans ce contexte, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pourrait induire une séquestration de Sf1 au niveau de certains gènes, tout en bloquant le recrutement de ce facteur de transcription au niveau d'autres gènes cibles (Walczak et al., 2014). Ainsi l'expression des gènes Sf1



dépendants et Lef/Tcf/ $\beta$ -caténine-dépendants pourrait être modulée en fonction du contexte cellulaire.

La  $\beta$ -caténine peut également agir comme un répresseur transcriptionnel. Ceci a notamment été mis en évidence dans des cellules de mélanome où la  $\beta$ -caténine réprime l'expression de *p16INK4a*, un inhibiteur du cycle cellulaire, par interaction directe avec des sites Lef/Tcf du promoteur de ce gène (Delmas et al., 2007). Les mécanismes à l'origine de cette répression de la transcription ne sont pas encore bien établis, mais quelques données chez la drosophile impliquent le recrutement de répresseurs (Bauer et al., 2000; Valenta et al., 2012; Weiske et al., 2007).

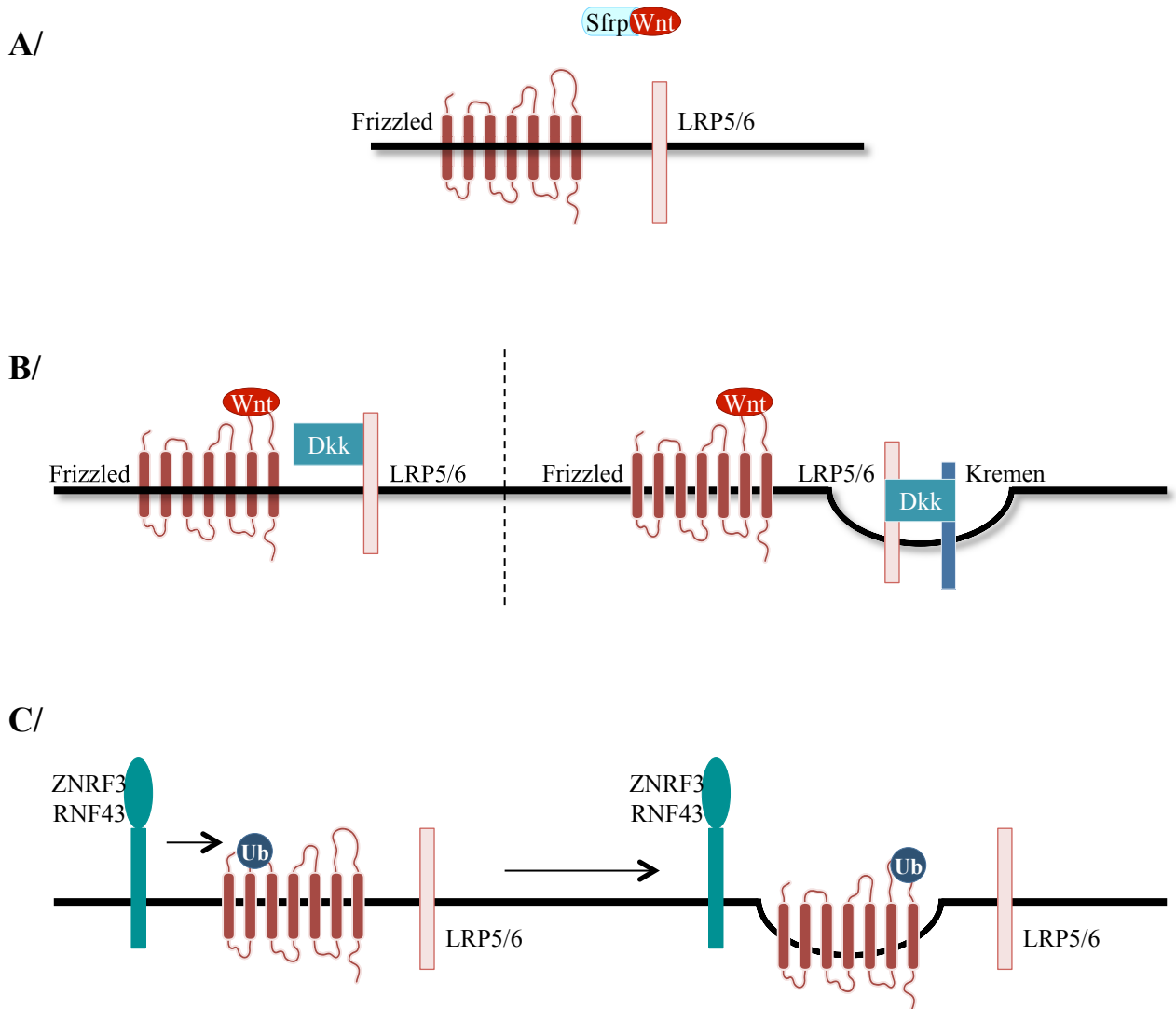
### 3. Les modulateurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut être modulée par différentes protéines agissant en tant qu'inhibiteurs ou à l'inverse comme modulateurs positifs de la voie (Cruciat and Niehrs, 2013).

#### *a/ Les antagonistes de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine*

Les antagonistes de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine peuvent être classés en deux catégories, en fonction de leur action sur les ligands Wnt ou sur les récepteurs de la voie (Kawano and Kypta, 2003).

Les SFRP (Secreted Frizzled-Related Protein) possèdent un domaine homologue au domaine CRD du récepteur Fz, leur permettant d'interagir avec les ligands Wnt. En revanche ces protéines sont sécrétées et ne possèdent pas de domaine transmembranaire (Bovolenta et al., 2008). Le mode d'action de ces inhibiteurs passe donc par la liaison du ligand afin de bloquer son interaction avec les récepteurs Fz et LRP5/6, empêchant l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Figure 30A) (Lin et al., 1997). Du fait de leur action inhibitrice sur la signalisation  $\beta$ -caténine, les SFRP peuvent agir comme des suppresseurs de tumeurs. Ainsi, la perte ou la diminution d'expression des SFRP est observée dans divers cancers et associée à l'activation de la voie  $\beta$ -caténine (Bovolenta et al., 2008; Elston et al., 2008; Nojima et al., 2007; Suzuki et al., 2008). Toutefois certains des SFRP ne présentent pas systématiquement un effet répresseur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, dans des cellules d'adénocarcinome



**Figure 30: Les antagonistes de la voie Wnt/β-caténine.**

**A/** Les Sfrp possèdent un domaine homologue au domaine CRD du récepteur Frizzled, responsable de l'interaction avec les ligands Wnt. L'association Sfrp-Wnt empêche la liaison du ligand à ses co-récepteurs et donc l'activation de la voie Wnt/β-caténine.

**B/** Deux modes d'action ont été décrits pour les inhibiteurs Dkk. Les Dkk, en interagissant avec le récepteur LRP5/6, empêchent la formation du complexe Frizzled-Wnt-LRP et donc l'activation de la signalisation β-caténine (panneau de gauche). Les Dkk peuvent, en plus de LRP5/6, interagir avec une protéine transmembranaire Kremen. Ce complexe est ensuite internalisé, bloquant la voie Wnt/β-caténine (panneau de droite).

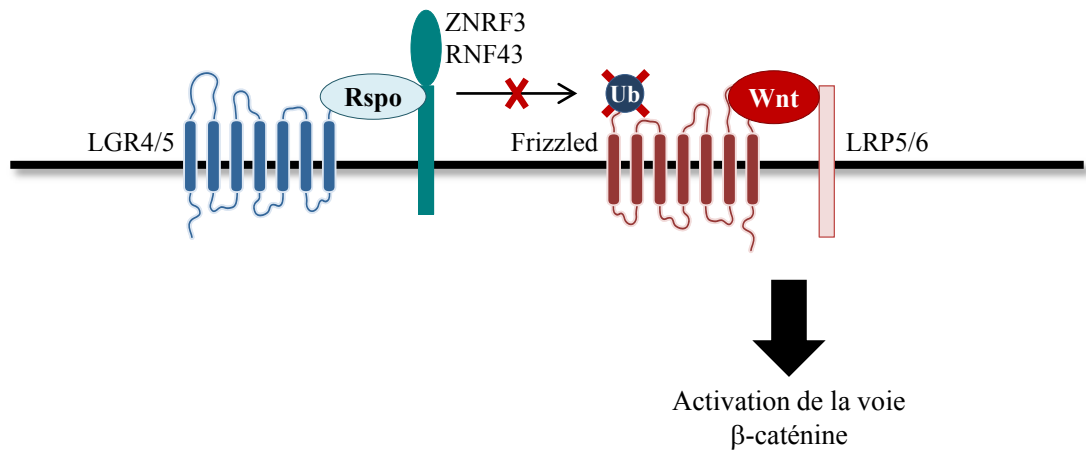
**C/** ZNRF3 et RNF43 sont des ubiquitines E3 ligases responsables de l'ubiquitination du récepteur Frizzled. Ceci entraîne son internalisation et sa dégradation, empêchant la voie Wnt/β-caténine d'être activée.

mammaire humain, l'expression de Sfrp2 favorise l'accumulation de la  $\beta$ -caténine et augmente la résistance à l'apoptose, alors que SFRP1 diminue la stabilité de la  $\beta$ -caténine et stimule la mort cellulaire (Melkonyan et al., 1997). Ainsi certains SFRP pourraient agir plutôt positivement sur la voie Wnt canonique. Ceci pourrait passer en outre par la capacité des SFRP à favoriser la diffusion des ligands Wnt. En effet, chez le xénope il a été démontré que les Sfrp favorisent la diffusion de ligands Wnt et que les complexes Sfrp/Wnt gardent leur capacité à activer la voie de signalisation  $\beta$ -caténine (Mii and Taira, 2009). Les Sfrp pourraient donc, en fonction du contexte cellulaire, permettre la diffusion de ligands Wnt au delà de leur site de production et donc l'activation de la voie ou au contraire séquestrer les ligands et inactiver la voie (Mii and Taira, 2009).

Les glycoprotéines Dkk (Dickkopf) appartiennent à la seconde catégorie d'inhibiteurs de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, interagissant avec les récepteurs LRP5/6 (Bafico et al., 2001; Mao and Niehrs, 2003; Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001). Deux modes d'actions ont été décrits pour les Dkk. En liant le co-récepteur LRP5/6, les Dkk bloquent l'interaction du ligand Wnt avec son co-récepteur, inhibant la formation du complexe Fz-Wnt-LRP5/6 et donc l'activation de la voie (Figure 30B) (Semenov et al., 2001). D'autre part, les Dkk présentent une forte affinité pour une protéine transmembranaire Kremen, qui constitue un récepteur pour ces protéines (Mao et al., 2002). L'association Dkk, LRP5/6 et Kremen induit l'internalisation du récepteur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine empêchant son activation (Figure 30B) (Mao et al., 2002). Comme pour les SFRPs, l'expression des Dkk peut être diminuée dans certains cancers, notamment dans le cancer du colon (Sato et al., 2007). L'augmentation d'expression de Dkk1 dans des cellules de cancer de colon diminue les capacités oncogéniques de ces cellules *in vitro*, ainsi que la croissance tumorale en modèle de xénogreffe, suggérant un rôle de suppresseurs de tumeurs pour ces antagonistes de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Aguilera et al., 2006; Qi et al., 2012).

La régulation des récepteurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine passe également par des ubiquitines E3 ligases transmembranaires ZNRF3 (Zinc and Ring Finger 3) et RNF43 (Ring Finger 43). Il a été montré que ces deux facteurs régulent négativement la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Hao et al., 2012; Jiang et al., 2013). Ces ubiquitines E3 ligases sont responsables de l'ubiquitination du récepteur Fz, induisant son endocytose et sa dégradation, bloquant ainsi l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Figure 30C) (Hao et al., 2012; Koo et al., 2012). Les mécanismes à l'origine de l'identification de Fz par ZNRF3 et RNF43 ne sont pas encore





**Figure 31: Les agonistes de la voie Wnt/β-caténine.**

Les protéines R-spondin (Rspo) lient leurs récepteurs LGR4 ou LGR5 et interagissent avec les ubiquitines E3 ligases ZNRF3 et RNF43, responsable de l'ubiquitination et donc la dégradation du récepteur Frizzled. Cette interaction induit la perte de ZNRF3 et RNF43 à la membrane plasmique. Le récepteur Frizzled est donc davantage présent à la membrane, permettant de stimuler l'activation de la voie Wnt/β-caténine en présence de ligand.

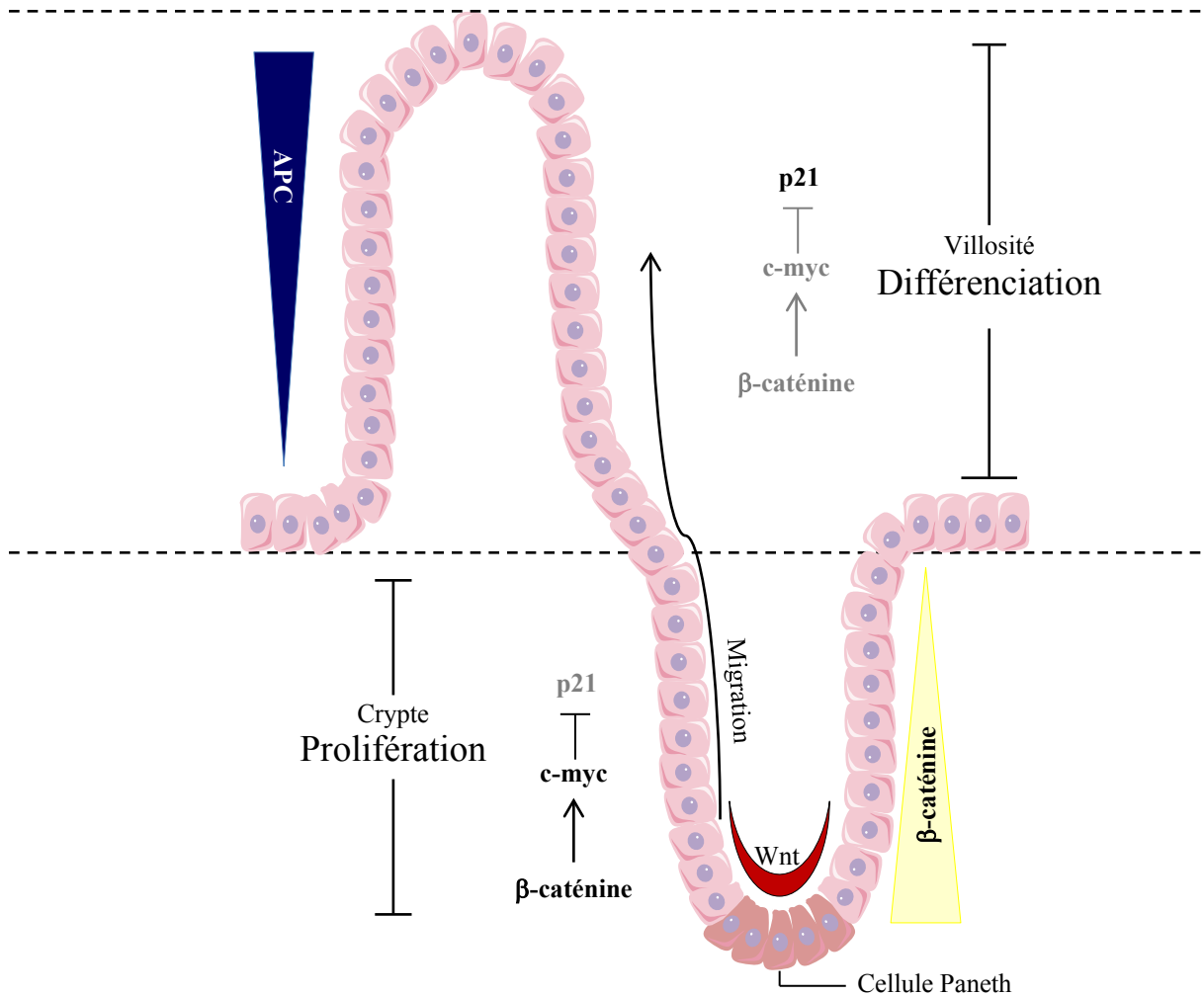
caractérisés (de Lau et al., 2014). ZNRF3 et RNF43 ont été retrouvés mutés dans divers cancers (Furukawa et al., 2011; Jiang et al., 2013; Ong et al., 2012; Ryland et al., 2013; Wu et al., 2011; Zhou et al., 2013; Zou et al., 2013) et l'invalidation de ces deux facteurs dans l'épithélium intestinal à l'aide du système Cre/Lox chez la souris, induit le développement d'adénomes avec une forte accumulation de  $\beta$ -caténine et une augmentation de l'expression des gènes cibles de la voie (Koo et al., 2012). ZNRF3 et RNF43 agissent donc comme inhibiteurs de la voie Wnt *in vivo* et peuvent se comporter comme suppresseurs de tumeurs.

#### ***b/ Les agonistes de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine***

La famille des R-spondin (Rspo) est une famille de quatre protéines (Rspo1-4) sécrétées, capables de stimuler la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Les Rspo activent la voie en synergie avec les ligands Wnt (Binnerts et al., 2007; Kazanskaya et al., 2004; Kim et al., 2005, 2008b). Les récepteurs à sept domaines transmembranaire LGR5 et LGR4 interagissent avec les Rspo et sont nécessaires à la stimulation de la voie  $\beta$ -caténine par ces protéines (Carmon et al., 2011; Glinka et al., 2011; de Lau et al., 2011). Le mécanisme conduisant à la stimulation de l'activité de la  $\beta$ -caténine par les Rspo a été mis en évidence par Hao et ses collaborateurs en 2012. Les auteurs ont démontré que les Rspo induisent une augmentation de la présence des récepteurs Fz et LRP à la membrane des cellules. De plus, ces protéines sécrétées sont capables d'interagir avec l'ubiquitine E3 ligase ZNRF3. Ainsi en s'associant avec leur récepteur LGR4, ces protéines favorisent l'interaction entre ZNRF3 et ce récepteur. Cette association est à l'origine d'une diminution de la présence de ZNRF3 à la membrane (Figure 31) (Hao et al., 2012). En favorisant la perte de ZNRF3 et RNF43 à la membrane, les Rspo permettent donc d'augmenter la présence des récepteurs de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, stimulant en présence de ligand, l'activation de la voie.

### **B/ La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la physiopathologie**

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine régule de nombreux processus cellulaires, comme la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Elle joue donc un rôle important dans le développement, le maintien de l'homéostasie et le renouvellement de nombreux tissus (MacDonald et al., 2009). Au vu de ces fonctions, la dérégulation de cette voie peut conduire au développement tumoral dans divers tissus (Polakis, 2007).



**Figure 32 : La voie Wnt/β-caténine dans le maintien des progéniteurs.**

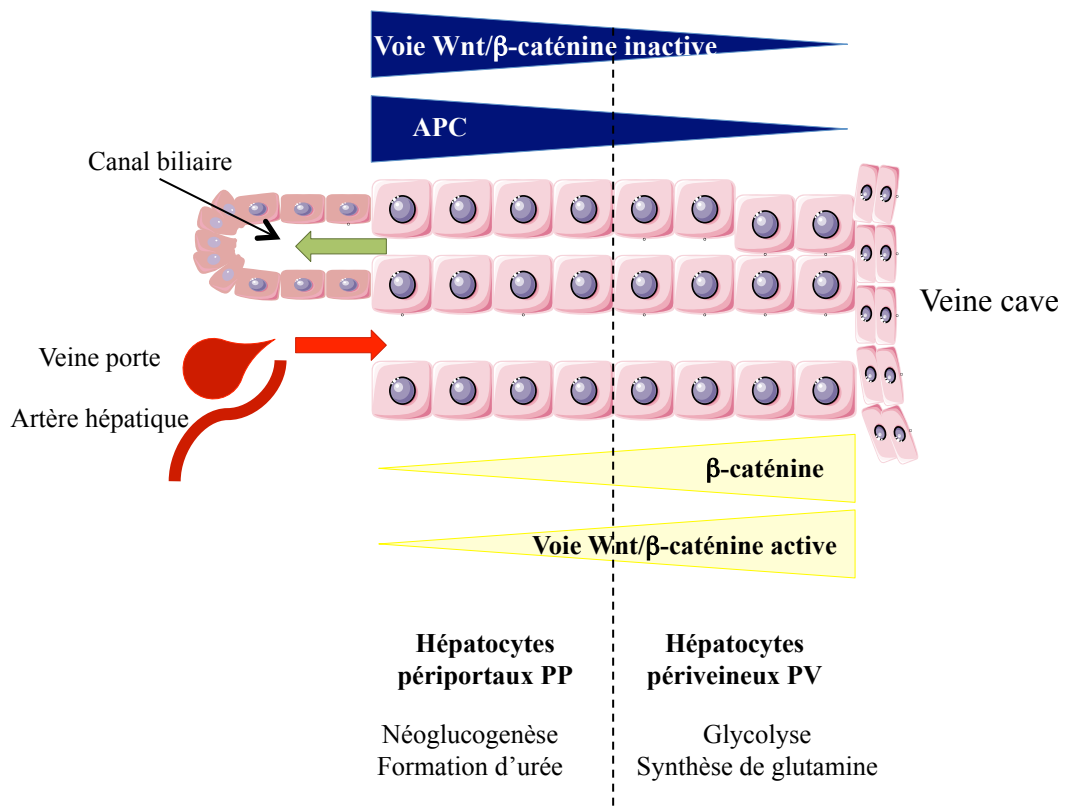
Au niveau de l'intestin, les ligands Wnt sont sécrétés par les cellules de Paneth, localisées au fond des cryptes. Ceci permet l'activation de la β-caténine dans les cellules proches de la source de ligand. Un gradient d'activation de la voie Wnt/β-caténine est donc établi avec une activité décroissante allant des cryptes aux villosités. L'activité de la voie Wnt/β-caténine est également inhibée dans les cellules des villosités par la présence dans ces cellules de APC.

L'activation de la β-caténine permet l'expression de c-myc qui inhibe p21, permettant la prolifération des cellules souches indifférenciées. La diminution d'activité de cette voie induit donc un arrêt de prolifération et la différenciation.

## 1. Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien des progéniteurs

La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est impliquée dans le renouvellement cellulaire par son action sur le maintien de cellules souches adultes et de progéniteurs (Holland et al., 2013). Cette fonction clé de la voie a notamment été mise en évidence au niveau de l'intestin (Pinto and Clevers, 2005). Dans ce tissu, la  $\beta$ -caténine s'accumule dans les cellules à la base des cryptes (van de Wetering et al., 2002). Ce compartiment constitue la réserve de progéniteurs de ce tissu. Ces cellules progénitrices ont la capacité de migrer selon l'axe crypte-villosité afin d'acquérir une identité différenciée (Pinto and Clevers, 2005). Ceci s'accompagne d'une diminution de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, permettant d'établir un gradient décroissant d'activation de cette voie de signalisation allant des cryptes, des cellules souches et progéniteurs, vers les cellules différenciées des villosités (Figure 32) (van de Wetering et al., 2002). La mise en place de ce gradient pourrait se faire par la localisation du ligand Wnt. Les cellules de Paneth, cellules différenciées sécrétant des agents antimicrobiens et localisées au fond des cryptes, sont la source de ligand Wnt3a dans l'intestin (Gregorieff et al., 2005; Sato et al., 2011). En migrant dans l'axe crypte-villosité, les cellules s'éloignent de la source du ligand et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine serait donc moins active dans ces cellules (Figure 32). L'absence d'activité  $\beta$ -caténine dans les cellules des villosités pourrait induire un arrêt de la prolifération et la différenciation des cellules de ce compartiment (Pinto and Clevers, 2005). Dans des cellules humaines de cancer colorectal (CCR), l'utilisation d'un dominant négatif du facteur de transcription TCF4 pour inhiber la signalisation  $\beta$ -caténine, induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'acquisition de caractéristiques de cellules différenciées (van de Wetering et al., 2002). Différents modèles animaux ont permis de démontrer l'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien de la réserve de progéniteurs de ce tissu. En effet, l'invalidation de la  $\beta$ -caténine spécifiquement dans l'intestin ou l'augmentation d'expression de l'inhibiteur Dkk1 conduisent à une diminution de prolifération des cellules souches intestinales, aboutissant à la perte des cryptes (Fevr et al., 2007; Kuhnert et al., 2004; Pinto et al., 2003). Cette voie de signalisation est donc indispensable à la prolifération des cellules souches/progéniteurs de l'intestin. Par ce rôle, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est essentielle au maintien et au renouvellement de l'épithélium intestinal (Pinto and Clevers, 2005).

Dans le cortex surrénalien, une action de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sur le maintien et/ou la prolifération des cellules progénitrices capsulaires et sous-capsulaires est suggérée par l'étude des modèles murins invalidés pour la  $\beta$ -caténine ou à l'inverse présentant une



**Figure 33 : La voie Wnt/β-caténine dans la zonation hépatique.**

Dans la travée hépatocytaire, la protéine APC se localise dans les hépatocytes périportaux (PP). La présence de APC dans ces hépatocytes induit une inactivation de la voie Wnt/β-caténine. De l'autre côté de la travée, l'absence d'APC dans les hépatocytes périveineux (PV) permet l'accumulation de la β-caténine et donc l'activation de la voie. L'absence d'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les hépatocytes permet leur différenciation en hépatocytes PP, alors que l'activation de cette signalisation induit une différenciation en hépatocytes PV. Ces deux types d'hépatocytes présentent des fonctions différentes, résultant de la différence d'expression de gènes en fonction de l'état d'activation de la voie Wnt/β-caténine

D'après Torre et al., 2011.

activation constitutive de cette voie de signalisation (Berthon et al., 2010; Kim et al., 2008a) (voir chapitre III. B/ 3.).

## 2. Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la zonation hépatique

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut être impliquée dans la différenciation des cellules et peut jouer un rôle dans la zonation de certains organes tels que le foie. Les hépatocytes sont des cellules spécialisées dont la fonction est dépendante de leur localisation. On distingue les hépatocytes dit périportaux (PP) des hépatocytes périveineux (PV) (Torre et al., 2011). L'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans cette zonation a d'abord été suggérée par l'analyse de la localisation de APC et de la  $\beta$ -caténine active dans le foie adulte de souris. L'expression de APC suit un gradient dans les lobules hépatiques, avec une accumulation importante dans les hépatocytes PP et une diminution jusqu'aux hépatocytes PV, où cette protéine n'est pas détectable (Figure 33) (Benhamouche et al., 2006). Dans les cellules de type PV, une accumulation de  $\beta$ -caténine active a été mise en évidence (Benhamouche et al., 2006). La délétion de *Apc* dans un modèle murin par utilisation d'un système Cre/Lox inducible, induit l'expression du programme génétique des hépatocytes PV dans l'ensemble du lobule (Benhamouche et al., 2006). A l'inverse, l'inhibition de la voie de signalisation  $\beta$ -caténine par l'expression de *Dkk1* dans le foie est à l'origine d'un phénotype PP dans la totalité du lobule (Benhamouche et al., 2006). Ainsi l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine induit la différenciation en hépatocytes PV, alors que l'absence d'activation de cette signalisation dans les hépatocytes est à l'origine d'hépatocytes de type PP. Ceci fait donc de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et du gradient d'expression de APC, des acteurs essentiels de la zonation hépatique.

## 3. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la tumorigénèse

Des altérations de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont fréquemment observées dans divers cancers, notamment pour les tissus dont le renouvellement et l'homéostasie sont régulés par cette signalisation (Polakis, 2007). La polypose adénomateuse familiale (PAF) est un syndrome familial prédisposant au développement du cancer colorectal (CCR), causé classiquement par des mutations dans le gène *APC* (Half et al., 2009). Les mutations inactivatrices de ce gène conduisent à une déstabilisation du complexe de destruction,



entraînant la stabilisation et l'activation de la  $\beta$ -caténine. Dans les CCR sporadiques des mutations non-sens de APC sont retrouvés dans 80% des cas (Gregorieff and Clevers, 2005). Dans les CCR non mutés pour *APC*, des mutations inactivatrices du gène *Axin2* ou des mutations à l'origine de la stabilisation de la  $\beta$ -caténine sont observées (Liu et al., 2000b; Morin et al., 1997; Segditsas and Tomlinson, 2006). Différents modèles murins ont démontré que ces altérations sont à l'origine du développement tumoral au niveau de l'épithélium intestinal (Taketo and Edelmann, 2009). Les souris *Apc*<sup>Min/+</sup> (Multiple intestinal neoplasia), portant une mutation non-sens du gène *Apc*, présentent un phénotype proche de celui des patients PAF avec le développement de nombreux adénomes intestinaux (Moser et al., 1990; Su et al., 1992). Toutefois, la plupart des adénomes se localisent principalement dans l'intestin grêle, alors que les patients présentent de multiples adénomes au niveau du colon. D'autres modèles murins présentant des altérations dans le gène *Apc* ont été développés (McCart et al., 2008). Les souris *Apc*<sup>14/+</sup> (délétion de l'exon 14 de *Apc*) reproduisent un phénotype plus proche des patients, avec notamment des adénomes principalement localisés dans le colon (Colnot et al., 2004). De même, des souris exprimant une forme constitutivement active la  $\beta$ -caténine spécifiquement dans l'épithélium intestinal, développent un nombre important de polypes (Harada et al., 1999). Comme décrit précédemment, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est une signalisation nécessaire au maintien et à la prolifération des cellules souches intestinales. Ainsi, les altérations conduisant à la stabilisation et à l'activation de la  $\beta$ -caténine dans l'épithélium intestinal sont des événements initiateurs de la tumorigenèse dans ce tissu et seraient à l'origine d'une prolifération incontrôlée de cellules conservant au moins partiellement leur identité de cellules souches (Reya and Clevers, 2005).

Depuis la découverte du rôle oncogénique de la  $\beta$ -caténine dans l'intestin, celui-ci a été étendu à la quasi totalité des cancers (Polakis, 2000), faisant de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, un acteur clé de la tumorigenèse.

### **C/ La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale**

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine intervient dans le développement et le maintien de la cortico-surrénale. Toutefois sa dérégulation, comme dans d'autres tissus, pourrait induire le développement tumoral.





L'implication de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans le développement des tumeurs cortico-surréaliennes a été initialement supposée par une fréquence accrue de ces tumeurs chez les patients souffrant de PAF. Ainsi, environ 13% de ces patients développent des tumeurs de la cortico-surrénale, mais très peu de CCS (Marchesa et al., 1997; Smith et al., 2000).

Une première analyse de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les tumeurs cortico-surréaliennes sporadiques a donc été conduite. Celle-ci a mis en évidence une accumulation nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine dans 22 des 39 tumeurs cortico-surréaliennes analysées (Tissier et al., 2005). Ces premières données ont été confirmées sur des cohortes plus importantes, avec 51% des ACS et 39,2% des CCS présentant une activation de la voie  $\beta$ -caténine (Bonnet et al., 2011; Gaujoux et al., 2011).

### 1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les adénomes cortico-surréaliens

Soixante-dix pourcents des ACS avec une accumulation nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine présentent une mutation activatrice du gène *CTNNB1* codant la  $\beta$ -caténine. Ces mutations touchent les résidus serine et thréonine ciblés par le complexe de destruction (Bonnet et al., 2011). Ces ACS altérés pour *CTNNB1* ont également un poids et une taille plus importants que les tumeurs non mutées (Bonnet et al., 2011). Ainsi, ces ACS activés pour la  $\beta$ -caténine sont plutôt associés à un phénotype plus agressif. Cette étude s'est également intéressée au statut hormonal de ces tumeurs. Les ACS mutés pour *CTNNB1* sont majoritairement non sécrétants (61.1%). L'état d'activation de la signalisation Wnt n'avait jusqu'alors pas été évalué dans les APA. Comme décrit précédemment, notre équipe a pu montrer que 70% des APA analysés présentent une activation anormale de la voie  $\beta$ -caténine, mise en évidence par une accumulation nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et une augmentation de l'expression de gènes cibles de la voie (Berthon et al., 2014). Cette activation n'est pas le résultat d'une mutation de *CTNNB1*, mais semble résulter d'une diminution d'expression de l'inhibiteur de cette signalisation, *SFRP2* (Berthon et al., 2014).



## 2. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les carcinomes cortico-surrénaux

Dans les CCS, l'activation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est associée à des stades plus avancés (stade III et IV), à un score de Weiss plus élevé et à une survie globale et sans récurrence plus courte (Gaujoux et al., 2011). L'activation de  $\beta$ -caténine est donc associée à un mauvais pronostic. Ces données sont confirmées par une analyse transcriptomique qui a mis en évidence un sous-groupe de CCS de mauvais pronostic, associé à l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Ragazzon et al., 2010). L'activation de la  $\beta$ -caténine semble donc impliquée dans un phénotype tumoral plus agressif. L'origine de l'activation de la voie dans les CCS peut être expliquée par des mutations activatrices du gène *CTNNB1*, observées dans 16.9% des tumeurs malignes (Gaujoux et al., 2011) et des mutations inactivatrices de *APC*, retrouvées dans 2% des CCS (Assié et al., 2014) mais également par des mutations dans le gène codant l'ubiquitine E3 ligase ZNRF3 dans 21% des CCS analysés (Assié et al., 2014). Celles-ci sont potentiellement associées à une perte de fonction, qui pourrait expliquer une activation anormale de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Assié et al., 2014). La démonstration formelle de ce phénomène n'a toutefois pas encore été apportée dans la cortico-surrénale. L'activation de la  $\beta$ -caténine, par différents mécanismes (mutations activatrices de *CTNNB1*, mutations inactivatrices de *APC* ou *ZNRF3*) est donc un événement fréquent dans les CCS et cette altération est associée à des tumeurs de mauvais pronostic.

Ainsi la  $\beta$ -caténine pourrait être un acteur important du développement tumoral cortico-surrénalien. En accord avec cette hypothèse, l'utilisation d'un antagoniste de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine, le PKF115-584, inhibe la prolifération de cellules tumorales cortico-surrénales humaines H295R (Doghman et al., 2008). De la même façon, l'inhibition de la  $\beta$ -caténine dans ces mêmes cellules par l'utilisation de shARN, conduit à une diminution de prolifération avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et à une augmentation de l'apoptose (Gaujoux et al., 2013). *In vivo*, l'inhibition de la  $\beta$ -caténine par cette même approche (shARN) dans un modèle de xénogreffes de H295R, prévient le développement de la tumeur (Gaujoux et al., 2013).

Afin de démontrer formellement l'implication de la  $\beta$ -caténine dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne, l'équipe a généré un modèle murin d'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine, spécifiquement dans le cortex surrénalien (Berthon et al., 2010). Pour cela, des souris exprimant la recombinaison Cre sous le contrôle de séquences régulatrices de *Akr1b7* (Lambert-Langlais et al., 2008) ont été croisées avec des souris présentant des sites LoxP de



part et d'autre de l'exon 3 du gène *Ctnnb1* (Harada et al., 1999). L'exon 3 code les résidus serine/thréonine dont la phosphorylation par le complexe de destruction conduit à la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Ces souris  $\Delta$ Cat développent toutes à 10 mois des tumeurs bénignes sécrétrices d'aldostérone et une dysplasie corticale et médullaire. A 18 mois, seulement 20 à 30% de ces souris développent un CCS (Berthon et al., 2010). Ainsi, ces données démontrent que la  $\beta$ -caténine initie le développement tumoral cortico-surrénalien mais que d'autres altérations sont nécessaires pour la progression maligne. Conformément à cette hypothèse, les souris invalidées pour *Apc* spécifiquement dans le cortex surrénalien, présentent également une hyperplasie corticale à partir de 10 mois mais ne développent pas de carcinome (Heaton et al., 2012).

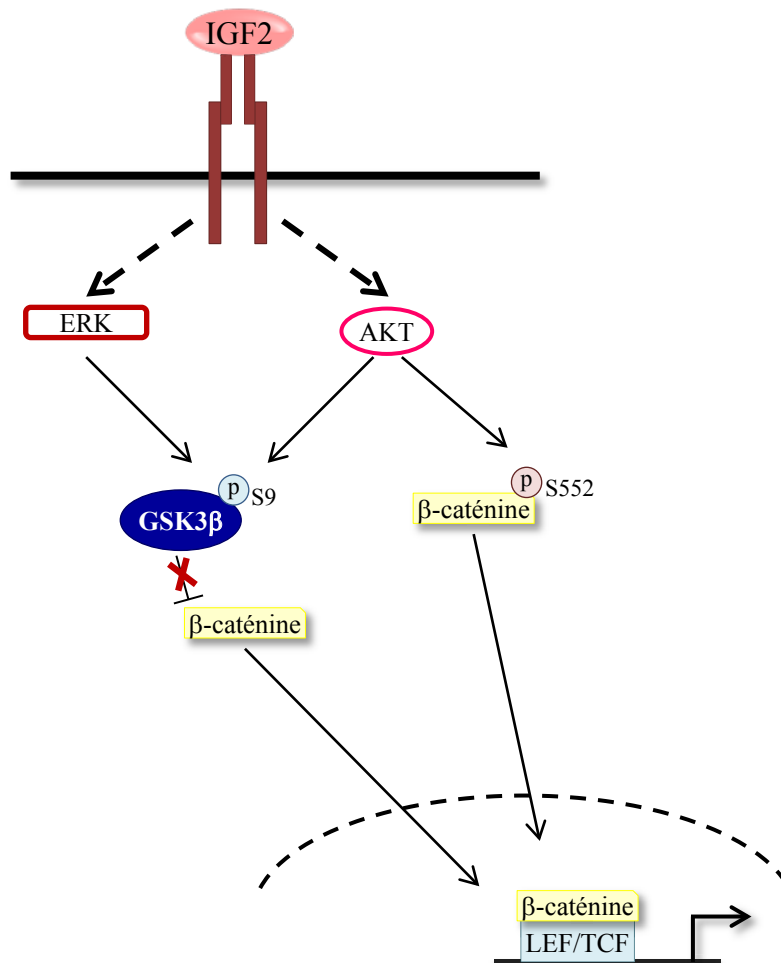
En conclusion, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est un événement fréquent dans les tumeurs de la cortico-surrénale. Dans les CCS, cette activation est associée à des tumeurs plus agressives, de mauvais pronostic. Les modèles animaux ont permis de démontrer que la stabilisation de la  $\beta$ -caténine est suffisante pour déclencher le développement tumoral. Toutefois la faible pénétrance de CCS dans ces modèles suggère la nécessité d'autres altérations pour la progression maligne.

## **D/ Interactions de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine avec d'autres voies de signalisation**

L'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut être modulée par différentes voies de signalisation. Celles-ci pourraient jouer un rôle pour favoriser l'acquisition de caractéristiques agressives. Ce chapitre se focalisera sur les voies IGF et PKA qui sont toutes les deux dérégulées dans les tumeurs de la cortico-surrénale.

### **1. La voie de signalisation IGF2**

La surexpression du facteur de croissance IGF2 est l'altération la plus fréquente dans les CCS (80-90% des CCS) (Gicquel et al., 1997b; Giordano et al., 2003). En revanche, l'augmentation d'expression de IGF2 est observée dans moins de 10% des ACS (Gicquel et al., 1997b).



**Figure 34 : Interaction des signalisations IGF2 et β-caténine.**

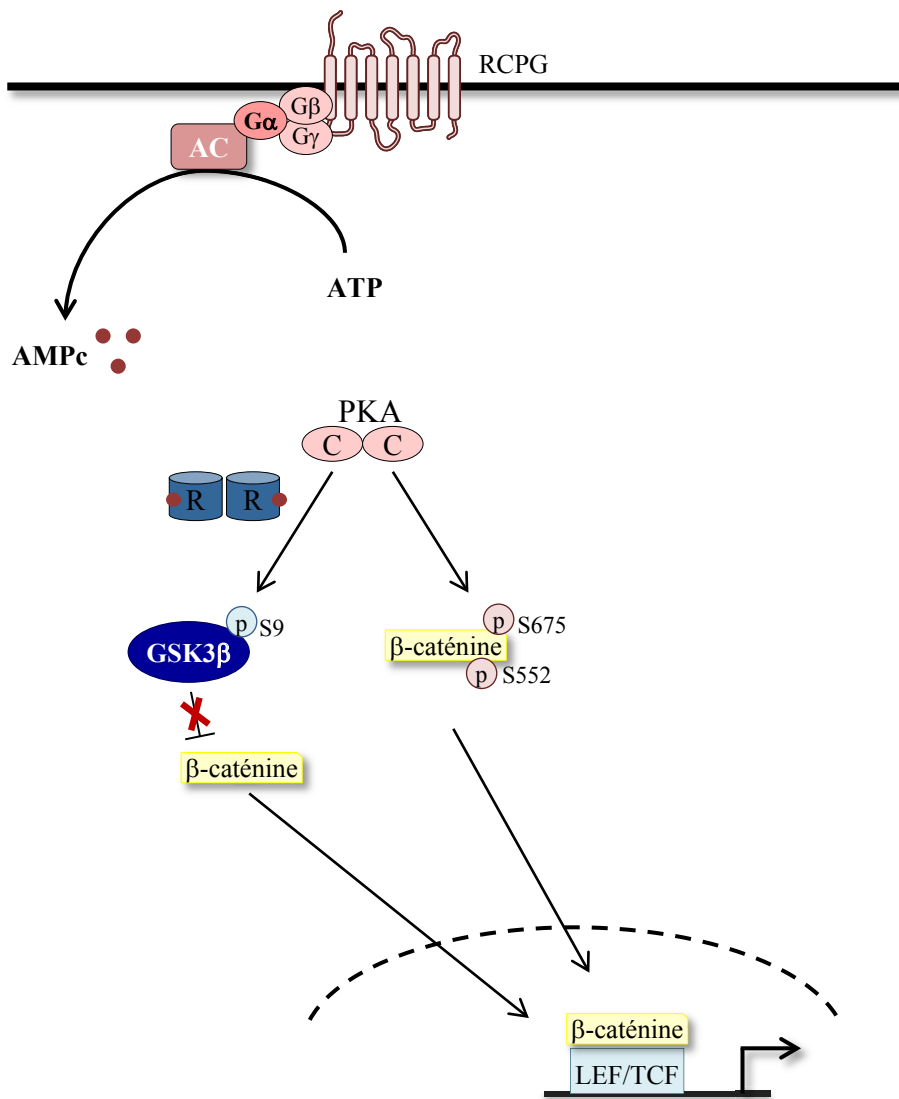
La liaison de IGF2 à son récepteur IGF-IR induit l'activation de AKT et de ERK. AKT est capable de phosphoryler la β-caténine sur sa sérine 552 (S552), ce qui induit la translocation nucléaire de la β-caténine et l'activation de la transcription de ses gènes cibles. AKT est également capable de phosphoryler GSK3β sur sa sérine 9 (S9). ERK présente également cette capacité. Cette phosphorylation est à l'origine de l'inhibition de GSK3β, permettant la stabilisation de la β-caténine et donc l'activation de la voie.

Dans le cancer du sein, l'expression de IGF1 est associée à l'accumulation nucléocytoplasmique de la  $\beta$ -caténine (Sawyer et al., 2003). Ces données sont renforcées par des observations effectuées dans un modèle murin de cancer du colon (Hassan and Howell, 2000). En effet, des souris  $Apc^{Min/+}$  ont été croisées avec des souris ayant intégré un transgène permettant la surexpression de Igf2. Ces souris ( $Apc^{Min/+}$ ; Igf2) présentent une augmentation du nombre et de la taille des adénomes présents au niveau du colon, par comparaison avec les souris  $Apc^{Min/+}$ . De plus, la progression maligne et l'invasion sont plus fréquemment observées chez les souris double transgéniques (Hassan and Howell, 2000). A l'inverse, la délétion de l'allèle paternel chez les souris mutantes pour *Apc*, induit une réduction du nombre et du diamètre des adénomes intestinaux (Hassan and Howell, 2000). La surexpression de Igf2 peut donc être associée à l'activation de la voie  $\beta$ -caténine et facilite l'initiation et le développement tumoral. Ceci suggère que ces deux voies de signalisation pourraient agir ensemble dans le développement tumoral.

Cette coopération pourrait passer par l'augmentation de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en réponse à la voie IGF2. En effet dans des cellules épithéliales de vessie de rat, IGF2 induit la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et l'expression d'un gène rapporteur de l'activité de la voie (Morali et al., 2001). La signalisation IGF2 pourrait donc participer à l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Ce croisement peut impliquer l'activation des voies MAPK/ERK et PI3K/AKT. En effet, en culture cellulaire AKT1 a la capacité de phosphoryler la  $\beta$ -caténine sur sa sérine 552 (Fang et al., 2007). Cette phosphorylation induit la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et l'activation de la voie (Figure 34) (Fang et al., 2007). Un autre mécanisme de stabilisation de la  $\beta$ -caténine en réponse à IGF2, peut être l'inhibition de GSK3 $\beta$  par phosphorylation de sa serine 9 (Cohen and Frame, 2001). En effet, des analyses dans différents modèles cellulaires ont montré que AKT et ERK1/2, qui peuvent être activés en réponse à IGF2, ont la capacité de phosphoryler et d'inactiver GSK3 $\beta$ , permettant la stabilisation de la  $\beta$ -caténine (Figure 34) (Cross et al., 1995; Ding et al., 2005).

Dans la cortico-surrénale, la coopération des voies  $\beta$ -caténine et IGF2 pourraient donc être nécessaire pour le développement de CCS. Alors que l'activation constitutive  $\beta$ -caténine est suffisante pour l'initiation, la progression maligne pourrait donc nécessiter la surexpression du facteur Igf2 (Berthon et al., 2010).





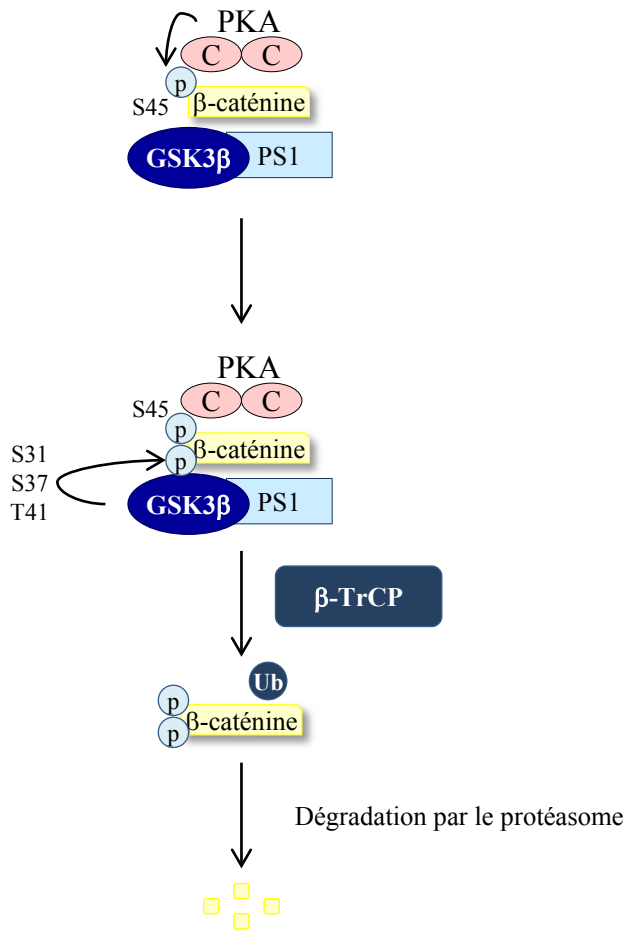
**Figure 35 : Interaction positive de la PKA sur la voie β-caténine.**

Suite à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), l'adénylate cyclase (AC) est activée, permettant la synthèse d'AMPc à partir d'ATP. L'activation de la PKA se fait par la liaison de molécules AMPc à ses sous-unités régulatrices (R), permettant la libération et l'activation des sous-unités catalytique (C). La PKA a la capacité de phosphoryler GSK3β sur sa sérine 9 (S9), induisant son inhibition et donc l'activation de la β-caténine. La PKA a aussi été décrite comme pouvant phosphoryler la β-caténine sur sa sérine 552 (S552) et sur sa sérine 675 (S675). Ces deux phosphorylations induisent une augmentation de l'activité de la β-caténine.

## 2. La voie de signalisation PKA

La voie de la signalisation PKA fait partie des autres voies de signalisation pouvant interagir avec la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet dans différents systèmes cellulaires, son activation induit la stabilisation de la  $\beta$ -caténine et l'expression de ses gènes cibles grâce à la phosphorylation de GSK3 $\beta$  (Figure 35) (Fang et al., 2000; Khattak et al., 2010; Roy et al., 2009; Taurin et al., 2007). La PKA peut également agir directement sur la  $\beta$ -caténine. En effet, il a été montré que l'activation de la PKA, dans différents systèmes cellulaires, induit la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur ses sérines 552 et 675, augmentant son activité transcriptionnelle (Figure 35) (Hino et al., 2005; Law et al., 2013; Taurin et al., 2006). Plusieurs mécanismes sont avancés selon les études pour expliquer ce phénomène. Alors que Taurin et ses collaborateurs ne mettent pas en évidence de stabilisation de la  $\beta$ -caténine et suggèrent un recrutement accru de CBP par la phospho- $\beta$ -caténine, cette dernière semble protégée de la dégradation par la phosphorylation de la sérine 675 dans l'étude de Hino *et al.* D'autre part, la phosphorylation de ces deux sérines en réponse à l'activation de la PKA, peut induire une augmentation du recrutement de la  $\beta$ -caténine au niveau des facteurs de transcription TCF et Sfl (Law et al., 2013). Des analyses *in vivo* confirment l'interaction positive entre PKA et  $\beta$ -caténine. En effet, le traitement de souris APC<sup>Min/+</sup> avec un antagoniste de la PKA (Rp-8-Br-cAMPS) réduit la taille des adénomes ainsi que la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine (Brudvik et al., 2011). Ces résultats laissent supposer que l'activation de la PKA, par son action sur la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur les sérines 552 et 675, peut favoriser le développement tumoral dans l'intestin (Brudvik et al., 2011). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la phosphorylation de la sérine 675 pourrait être facilitée par un changement de conformation induit par la phosphorylation du résidu tyrosine 654 (Y654) (van Veelen et al., 2011). En effet, *in vivo*, une mutation phospho-mimétique de ce résidu (Y654E) dans un modèle murin portant une mutation inactivatrice de *Apc*, augmente l'initiation tumorale intestinale et est associée à une augmentation de la phosphorylation du résidu serine 675 (van Veelen et al., 2011). Toutefois, il est difficile de dissocier l'effet de cette mutation sur le transport nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine (voir chapitre V. A/ 2. c/), de son effet sur l'activité transcriptionnelle par l'intermédiaire de la sérine 675.

L'ensemble de ces études décrit donc un effet positif de la voie PKA sur la signalisation  $\beta$ -caténine. Toutefois, il a été montré que la PKA au sein d'un complexe



**Figure 36 : Interaction négative de la PKA sur la voie β-caténine.**

Au sein d'un complexe se composant de la PKA, de la préséniline (PS1), la β-caténine et GSK3β, la PKA induit la phosphorylation de la β-caténine sur sa sérine 45 (S45). Cette phosphorylation entraîne la phosphorylation de la β-caténine sur ses sérines 33 et 37 et sur sa thréonine 41 par GSK3β. La β-caténine est alors reconnue par l'ubiquitine E3 ligase β-TrCP, induisant sa dégradation par le protéasome.

comprenant la  $\beta$ -caténine, GSK3 $\beta$  et la préséniline est capable de phosphoryler la  $\beta$ -caténine sur sa sérine 45 (Kang et al., 2002). Les présénilines, PS1 (préséniline 1) et PS2 (préséniline 2) chez l'Homme, ont été impliquées dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Hardy, 1997). La PS1 s'associe avec la  $\beta$ -caténine et régule négativement son activité transcriptionnelle (Murayama et al., 1998; Soriano et al., 2001). Au sein du complexe, la phosphorylation de la sérine 45 de la  $\beta$ -caténine par la PKA permet la phosphorylation des sérines 33, 37 et de la thréonine 41 par GSK3 $\beta$  (Figure 36) (Kang et al., 2002). Dans certaines conditions, la PKA semble donc pouvoir favoriser l'inactivation de la  $\beta$ -caténine. De fait, même si Hino et ses collaborateurs concluent que la PKA stimule l'activité de la  $\beta$ -caténine en phosphorylant les résidus 552 et 675, ils observent également que l'activation de la PKA dans des cellules humaines de rein HEK-293, induit une phosphorylation des résidus inhibiteurs (Hino et al., 2005). Il est donc vraisemblable que la PKA puisse avoir des actions antagonistes sur l'activité de la  $\beta$ -caténine, en fonction de l'équilibre s'établissant entre phosphorylations activatrices et inactivatrices.

Dans la cortico-surrénale, une accumulation nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine a été observée dans des PPNAD même en absence de mutation activatrice du gène *CTNNB1* (Gaujoux et al., 2008; Tadjine et al., 2008). Ces tumeurs bénignes se développant dans un contexte d'activité accrue de la PKA, on peut supposer que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine résulte d'un effet positif de la PKA sur l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine. Toutefois dans le modèle murin de PPNAD développé au laboratoire par l'inactivation de la sous-unité régulatrice RI $\alpha$  de la PKA, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine n'est pas observée (Sahut-Barnola et al., 2010). L'interaction entre ces deux voies de signalisation doit donc être précisée dans le cas de tumeurs du cortex surrénalien.



## VI. PRESENTATION DES PROJETS DE RECHERCHE

### **A/ Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et IGF2 dans la tumorigénèse cortico-surrénalienne**

Les CCS sont des tumeurs malignes agressives de mauvais pronostic avec une survie à 5 ans inférieure à 40% (Allolio and Fassnacht, 2006). La chirurgie reste le principal traitement des CCS, associée à un traitement adjuvant au mitotane ayant un effet cytostatique sur les cellules cortico-surréaliennes. Toutefois le mitotane induit de nombreux effets secondaires et ne conduit pas à une réponse thérapeutique durable (Kirschner, 2012). Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement tumoral du cortex surrénalien, afin d'assurer une prise en charge plus efficace.

La combinaison d'approches transcriptomiques et immunologiques a permis l'identification de dérégulations associées au développement de CCS chez l'Homme. Les altérations les plus fréquentes dans les CCS sont la surexpression du facteur de croissance IGF2 retrouvée chez 80 à 90% des patients (Gicquel et al., 1997b; Giordano et al., 2003) et l'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, dans 39% des tumeurs malignes (Gaujoux et al., 2011). Afin de valider l'implication de la  $\beta$ -caténine dans la tumorigénèse surrénalienne, notre équipe a développé un modèle de souris transgéniques permettant l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine, spécifiquement dans le cortex surrénalien (souris  $\Delta$ Cat). Ces animaux ont permis de démontrer que la  $\beta$ -caténine initie le développement tumoral cortico-surrénalien (Berthon et al., 2010). Toutefois, la faible pénétrance du phénotype malin suggère la nécessité d'autres altérations pour la progression tumorale. La surexpression du facteur de croissance IGF2, observée dans plus de 80% des CCS mais moins de 10% des tumeurs bénignes (Gicquel et al., 1997b), pouvait constituer une de ces altérations. En effet, une coopération de ces deux voies a notamment été décrite dans un modèle murin de cancer colorectal (Hassan and Howell, 2000).

Afin d'évaluer le potentiel oncogénique de IGF2 dans la cortico-surrénale, l'équipe a généré deux modèles murins de surexpression de ce facteur, spécifiquement dans le cortex surrénalien. Ces souris portent un transgène dans lequel l'expression de l'ADNc murin de *Igf2* est dirigée soit par les régions régulatrices du gène *Akr1b7* (souris *AdIgf2*), soit par les régions régulatrices du gène *P450SCC* (souris *ScclIgf2*).



L'objectif initial de ma thèse était d'évaluer le potentiel oncogénique de IGF2 seul, ou en association avec l'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, afin de reconstituer la combinaison d'altérations la plus fréquente dans les CCS humains. Dans ce but, le phénotype tumoral des souris surexprimant Igf2 (AdIgf2 et Scc:Igf2) et des double-transgéniques ( $\Delta$ Cat;AdIgf2 et  $\Delta$ Cat;Scc:Igf2) a été analysé.

### Présentation des résultats

Les modèles de surexpression de Igf2 dans la cortico-surrénale nous ont permis de montrer que Igf2 n'initie pas le développement de tumeurs cortico-surrénaliennes, malgré une surexpression de 7 (en basal) à 87 fois (induit par l'ACTH). Toutefois Igf2 induit une accumulation anormale de cellules progénitrices. La combinaison de la surexpression de Igf2 et de l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine n'a pas d'effet sur le phénotype tumoral à des stades précoces. Toutefois, à des stades plus tardifs, Igf2 favorise une accélération du développement tumoral, caractérisée par une augmentation du score de Weiss et de la prolifération. La formation de tumeurs malignes est néanmoins un événement rare, même quand la surexpression de Igf2 est augmentée par un traitement à l'ACTH. Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de Igf2 et l'activation de la  $\beta$ -caténine ne sont pas suffisantes dans notre modèle, pour induire le développement de CCS.

A la suite de ces résultats, nous avons supposé que d'autres altérations devaient être nécessaires pour l'acquisition de la malignité. Une analyse rétrospective des données du transcriptome des patients a mis en évidence, dans les CCS, une surexpression de l'histone méthyltransferase (HMTase) EZH2 (Enhancer of Zest 2), responsable de la mise en place de la marque H3K27me3. Cette HMTase, dérégulée dans de nombreux cancers (Chase and Cross, 2011), pourrait être impliquée dans la progression tumorale cortico-surrénalienne. Afin d'étudier le rôle de EZH2 dans la tumorigenèse du cortex surrénalien, nous avons cherché à diminuer son expression dans des cellules de CCS humain H295R. L'inhibition de EZH2 a été conduite par deux approches, l'utilisation de siARN et l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique. Les résultats obtenus suggèrent un rôle de EZH2 dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose et de certaines capacités oncogéniques des cellules H295R. Nous avons également cherché à identifier les causes de la dérégulation de EZH2 dans les CCS. L'analyse rétrospective de données du transcriptome des CCS a mis en évidence une corrélation entre surexpression de EZH2 et de certains facteurs E2F, décrits comme des





régulateurs de EZH2 *in vitro* (Bracken et al., 2003). L'inhibition de l'expression de ces facteurs de transcription par siARN induit une diminution de EZH2, associée à une inhibition de la prolifération des cellules H295R. Ces résultats préliminaires suggèrent que la surexpression facteurs E2F dans les CCS peut stimuler l'expression de *EZH2*, qui en cascade, participe au développement tumoral.

## **B/ Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et PKA dans la zonation cortico-surrénalienne**

Le cortex surrénalien des rongeurs est divisé en deux zones fonctionnellement distinctes, la zone glomérulée sous la capsule et la zone fasciculée dans la partie interne du cortex. La zone glomérulée est responsable de la sécrétion d'aldostérone en réponse à l'angiotensine II. La zone fasciculée sécrète la corticostérone en réponse à l'ACTH. L'identité des zones du cortex surrénalien repose sur l'expression des enzymes terminales de la stéroïdogénèse, Cyp11b2 pour la glomérulée et Cyp11b1 pour la fasciculée. Cette zonation fonctionnelle est achevée en période périnatale (Laufer et al., 2012) et doit être maintenue au cours du renouvellement du cortex. Ce renouvellement repose sur le recrutement de progéniteurs capsulaires/sous-capsulaires qui ont la capacité de migrer et de se différencier séquentiellement en cellules de glomérulée, puis en cellules de fasciculée (Freedman et al., 2013; King et al., 2009). Même si certaines voies de signalisation semblent impliquées dans la différenciation des cellules cortico-surréaliennes, les mécanismes à l'origine de l'acquisition de l'identité de ces cellules ne sont pas totalement élucidés et notamment la transition glomérulée-fasciculée.

Différentes données ont permis d'impliquer l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'établissement de l'identité de la zone glomérulée. Tout d'abord, son activité est restreinte à cette zone dans le cortex surrénalien (Berthon et al., 2010; Kim et al., 2008a) et son activation constitutive dans le modèle  $\Delta$ Cat induit une différenciation ectopique de cellules Cyp11b2 + dans la zone fasciculée (Berthon et al., 2010). L'action de la  $\beta$ -caténine sur la différenciation glomérulée peut passer en partie par la régulation des gènes *AT1R* et *CYP11B2* nécessaires à l'identité glomérulée (Berthon et al., 2014), mais également par l'effet inhibiteur de la  $\beta$ -caténine sur l'expression des gènes *Mc2r* et *Cyp11b1*, spécifiques de la zone fasciculée (Walczak et al., 2014). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine, en induisant l'expression des acteurs de la



glomérulée et en inhibant les gènes spécifiques de la fasciculée, permet donc l'acquisition d'un phénotype glomérulée. La signalisation Wnt doit donc être réprimée pour permettre l'acquisition de l'identité fasciculée lors du renouvellement cortical.

L'identité de la zone fasciculée repose sur l'expression de l'enzyme Cyp11b1, dont l'expression est régulée par l'ACTH. Dans le cortex surrénalien, le récepteur à l'ACTH Mc2r et les protéines accessoires Mrap sont plus fortement exprimées dans la zone fasciculée que dans la zone glomérulée (Gorrigan et al., 2011). De plus, l'invalidation génétique de *Mc2r* chez la souris ou l'inhibition de la sécrétion d'ACTH induisent une atrophie de la zone fasciculée sans atteinte de la zone glomérulée (Chida et al., 2007; Freedman et al., 2013; Thomas et al., 2004). La signalisation ACTH est donc plus active dans la zone fasciculée et semble jouer un rôle essentiel pour sa différenciation.

Les voies Wnt/ $\beta$ -caténine et PKA interagissent dans de nombreux types cellulaires. Même si la plupart des études ont mis en évidence une action positive de la PKA sur l'activité de la  $\beta$ -caténine (voir chapitre V. D. 2.), une action inhibitrice a également été décrite (Kang et al., 2002). Nous avons donc émis l'hypothèse que la signalisation PKA, induite par la liaison de l'ACTH à son récepteur, pourrait être un des facteurs impliqués dans le blocage de la signalisation  $\beta$ -caténine pour permettre la différenciation fasciculée.

Le second objectif de ma thèse a donc été de définir l'interaction des voies Wnt/ $\beta$ -caténine et PKA dans le cadre de la zonation du cortex surrénalien. Pour cela, des approches pharmacologiques *in vivo* ont été combinées à des approches génétiques. Ces dernières reposaient sur l'activation constitutive de la PKA par invalidation de la sous-unité régulatrice RI $\alpha$ , spécifiquement dans le cortex surrénalien et sur une diminution d'activité PKA par invalidation hétérozygote de la sous-unité catalytique C $\alpha$  de la PKA. Grâce à l'ensemble de ces modèles, nous avons déterminé :

- 1) l'effet de la PKA sur la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et la zonation fonctionnelle du cortex dans un contexte physiologique aigu (pharmacologie) et chronique (modèles génétiques)
- 2) l'effet de la PKA sur la différenciation ectopique de cellules de glomérulée et sur les phénotypes tumoraux induits par l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine (modèles génétiques)



## Présentation des résultats

1) L'activation de la signalisation PKA par une approche pharmacologique (ACTH) ou génétique (invalidation de la sous-unité régulatrice RI $\alpha$  de la PKA) dans la cortico-surrénale induit une inhibition de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, conduisant à une perte de la différenciation glomérulée au profit d'une expansion de la zone fasciculée. L'effet de la PKA sur la voie Wnt semble passer en partie par la diminution d'expression de *Wnt4*, observée dans les surrénales des animaux traités à l'ACTH ou invalidés pour RI $\alpha$ . Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons invalidé *Wnt4* spécifiquement dans le cortex surrénalien. Ce modèle murin présente un phénotype proche des souris invalidées pour RI $\alpha$  avec une perte de la zone glomérulée et une expansion du domaine fasciculée. Ainsi l'activation de la PKA inhibe la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, en partie par la diminution d'expression de *Wnt4*, bloquant ainsi la différenciation glomérulée et favorisant l'expansion de la zone fasciculée.

2) La diminution d'activité de la PKA par l'invalidation de la sous-unité régulatrice RI $\alpha$  dans le modèle d'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine (souris  $\Delta$ Cat) a permis de réduire la différenciation ectopique de cellules de glomérulée et l'augmentation de prolifération, induites par l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine. A l'inverse, la diminution d'activité de la PKA par l'invalidation hétérozygote de la sous-unité catalytique C $\alpha$  chez les souris  $\Delta$ Cat induit une aggravation du phénotype tumoral et est associée à une augmentation de l'expression de gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. La PKA est donc également capable de limiter l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans un contexte tumoral.



# PREMIERE PARTIE:

Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et IGF2 dans la  
tumorigenèse cortico-surrénalienne





# RESULTATS ET DISCUSSION



# ARTICLE 1 :

## Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models

Coralie Drelon, Annabel Berthon, Bruno Ragazzon, Frédérique Tissier, Roberto Bandiera, Isabelle Sahut-Barnola, Cyrille de Joussineau, Marie Batisse-Lignier Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Jérôme Bertherat Antoine Martinez, Pierre Val.

PLoS ONE, 2012.

&

## Adrenocortical Cancer and IGF2: Is the Game Over or Our Experimental Models Limited?

Drelon C, Berthon A, Val P.

J Clin Endocrinol Metab. 2013, Commentary

(Voir Annexes)



# Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models

Coralie Drelon<sup>1,2,3</sup>, Annabel Berthon<sup>1,2,3\*</sup>, Bruno Ragazzon<sup>4,5,6\*</sup>, Frédérique Tissier<sup>4,5,6</sup>, Roberto Bandiera<sup>7</sup>, Isabelle Sahut-Barnola<sup>1,2,3</sup>, Cyrille de Jossineau<sup>1,2,3</sup>, Marie Batisse-Lignier<sup>1,2,3,8</sup>, Anne-Marie Lefrançois-Martinez<sup>1,2,3</sup>, Jérôme Bertherat<sup>4,5,6</sup>, Antoine Martinez<sup>1,2,3</sup>, Pierre Val<sup>1,2,3\*</sup>

**1** Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, Clermont-Ferrand, France, **2** CNRS UMR 6293, GReD, Aubière, France, **3** Inserm U1103, GReD, Aubière, France, **4** Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS UMR 8104, Paris, France, **5** Inserm U1016, Paris, France, **6** Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Endocrinology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Paris, France, **7** Inserm UMR636, Nice, France, **8** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France

## Abstract

Adrenal cortical carcinomas (ACC) are rare but aggressive tumours associated with poor prognosis. The two most frequent alterations in ACC in patients are overexpression of the growth factor IGF2 and constitutive activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. Using a transgenic mouse model, we have previously shown that constitutive active  $\beta$ -catenin is a *bona fide* adrenal oncogene. However, although all these mice developed benign adrenal hyperplasia, malignant progression was infrequent, suggesting that secondary genetic events were required for aggressive tumour development. In the present paper, we have tested IGF2 oncogenic properties by developing two distinct transgenic mouse models of Igf2 overexpression in the adrenal cortex. Our analysis shows that despite overexpression levels ranging from 7 (basal) to 87 (ACTH-induced) fold, Igf2 has no tumour initiating potential in the adrenal cortex. However, it induces aberrant accumulation of Gli1 and Pod1-positive progenitor cells, in a hedgehog-independent manner. We have also tested the hypothesis that Igf2 may cooperate with Wnt signalling by mating Igf2 overexpressing lines with mice that express constitutive active  $\beta$ -catenin in the adrenal cortex. We show that the combination of both alterations has no effect on tumour phenotype at stages when  $\beta$ -catenin-induced tumours are benign. However, there is a mild promoting effect at later stages, characterised by increased Weiss score and proliferation. Formation of malignant tumours is nonetheless a rare event, even when Igf2 expression is further increased by ACTH treatment. Altogether these experiments suggest that the growth factor IGF2 is a mild contributor to malignant adrenocortical tumorigenesis.

**Citation:** Drelon C, Berthon A, Ragazzon B, Tissier F, Bandiera R, et al. (2012) Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models. PLoS ONE 7(8): e44171. doi:10.1371/journal.pone.0044171

**Editor:** Zoran Culig, Innsbruck Medical University, Austria

**Received:** May 28, 2012; **Accepted:** July 30, 2012; **Published:** August 28, 2012

**Copyright:** © 2012 Drelon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This project was supported by Université Blaise Pascal; Université d'Auvergne; Centre National de la Recherche Scientifique; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, grant #SFI 20101201397) and La Ligue Régionale Contre le Cancer, Allier committee. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: pierre.val@univ-bpclermont.fr

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Adrenocortical carcinomas (ACC) are rare with an incidence of 0.5 to 2 new cases per year and per million [1]. However, these tumours are associated with bad prognosis. Eighty percent of ACC patients develop metastases, which results in five years survival rates of 16 to 47% depending on the series [2]. Most ACC (76%) are also associated with excessive hormone secretion [3,4]. Clinical management of these cancers mostly relies on resection of primary tumours and mitotane treatment alone [5] or in combination with chemotherapy [6]. However, almost half of the patients present with incurable metastatic disease at diagnosis [2,7]. Molecular analyses have shown that the two most frequent alterations in ACC are overexpression of Igf2 [8–10] and constitutive activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway [11–13]. We have recently shown that constitutive activation of  $\beta$ -catenin in the adrenal cortex of transgenic  $\Delta$ Cat mice resulted in adrenal hyperplasia and aggressive tumour formation in only a subset of

17 month-old animals [14]. This demonstrated that  $\beta$ -catenin was an adrenal oncogene but it also suggested that secondary genetic alterations were required for malignant progression. IGF2 is a growth factor involved in the control of cell proliferation and inhibition of apoptosis. The IGF2 gene locus at 11p15 is under the control of parental epigenetic imprinting. Loss of imprinting (LOI) at 11p15 causes Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) characterised by embryonic overgrowth and predisposition to tumour development, among which adrenocortical carcinomas [15]. In sporadic adrenal tumours, IGF2 is overexpressed in 80–90% of ACC but not in adrenocortical adenomas (ACA) [9,16]. In most cases, IGF2 overexpression results from loss of the maternal IGF2 allele and duplication of the paternal allele (paternal unidisomy) but it is also associated with alterations in epigenetic imprinting at 11p15 [8]. Other components of the IGF signalling pathway such as the IGFIR receptor [17] and IGF binding protein 2 (IGFBP2) [18] are also overexpressed in ACC. Altogether these observations suggest that overexpression of IGF2 could be involved in adrenal



tumourigenesis. Consistent with this idea, IGF1R antagonists can inhibit proliferation of the human adrenocortical carcinoma H295R cell line both in culture and in xenograft experiments [19,20].

Mouse models of increased Igf2 signalling recapitulate most of the developmental and growth abnormalities found in BWS, but fail to develop adrenal hyperplasia or tumours [21,22]. Transgenic mice with overexpression of human IGF2 under the control of the PEPCK promoter show 4 to 6 fold elevation of serum IGF2 levels and moderate transgene expression in the adrenal cortex. This results in mild adrenocortical hyperplasia characterised by a 1.5 fold increase in zona fasciculata volume [23]. However, these mice did not develop adrenocortical tumours over the 18 months time course of the study. This suggested that Igf2 overexpression might not initiate adrenal tumour development but that it could be involved in malignant progression.

In order to test this hypothesis, we have developed two transgenic mouse models in which mouse Igf2 is specifically overexpressed in the adrenal cortex through the regulatory regions of the *Akr1b7* or the *P450SCC* gene, which allow basal and ACTH stimulated transgene expression. We have also engineered a mouse model in which the two most frequent genetic alterations found in ACC patients were combined by mating Igf2 overexpressing mice with mice that express a constitutive active  $\beta$ -catenin in the adrenal cortex ( $\Delta$ Cat mice) [14].

Our analysis of these models shows that Igf2 overexpression does not induce adrenal tumour development although it triggers aberrant recruitment of adrenal progenitors cells in a hedgehog independent manner. We also show that Igf2 overexpression in the context of constitutive  $\beta$ -catenin activation only has a mild promoting effect on tumour progression. Altogether, these data strongly suggest that despite marked overexpression in adrenal carcinomas, Igf2 is unlikely to play a major role in either tumour initiation or progression in the adrenal cortex.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All animal studies were approved by Auvergne Ethics Committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare in order to minimize animal suffering.

### Construction of the transgenes

The 0.5 *Akr1b7*:Igf2 transgene was constructed by inserting the cDNA of mouse Igf2 into the 0.5 *Akr1b7*-CAT-int backbone. The 0.5*Akr1b7*-CAT-Int construct contains the -510/+44 fragment of the mouse *Akr1b7* gene fused to a reporter gene composed of the CAT coding sequence followed by the mini-intron and polyadenylation signal from SV40 T antigen sequences. These sequences are followed by 3.5 kb of an intragenic fragment spanning intron 1 to 2 of the *Akr1b7* gene. The CAT reporter gene was excised from the 0.5 *Akr1b7*-CAT-Int transgene by a *NcoI* digestion. This was followed by a fill-in of the cohesive ends by Klenow polymerase and subsequent *XhoI* digestion. The complete mouse Igf2 cDNA (positions 1126 to 1668 on sequence NM\_010514.2) was amplified from mouse liver mRNAs using primers Igf2-Fwd-5'-CCCTCGA-GACCATGGGATCCCAGTG-3' and Igf2-Rev-5'-AAAG-TACTTTTCTACTGATGGTTGCTGGAC-3'. These primers contained *XhoI* (Fwd) and *ScaI* (Rev) restriction sites that were included in the PCR fragment. After digestion with *XhoI* and *ScaI*, the PCR fragment was cloned into the *XhoI* and blunted *NcoI* sites of the 0.5 *Akr1b7*-Int construct.

The 4.5 *Sccl*:Igf2 transgene was constructed by cloning the regulatory sequences of the human *P450SCC* gene and mouse Igf2 cDNA in the pBL-CAT3 backbone. For this, the CAT gene was excised from the pBLCAT3 reporter plasmid by a *NcoI* digestion. This was followed by a fill-in of the cohesive ends by Klenow polymerase and subsequent *XhoI* digestion. The mouse Igf2 cDNA was the inserted in this plasmid as described above, resulting in the pBL-Igf2 construction. Regulatory regions from the human *P450SCC* gene (-4400/+55) were amplified from human genomic DNA using primers SCC-Fwd-5'-GCTCTA-GAGCGACCCCTCCCAAGGCCAAACAAA-3' and SCC-Rev-5'-CCCTCGAGGGGCCACAGCTGTGACTGTAC-3'. These contained an *XbaI* (Fwd) and an *XhoI* (Rev) sequence. The PCR product was digested by *XhoI* and *XbaI*. It was subsequently cloned into pBL-Igf2 after an *XhoI*/*XbaI* digestion.

### Mice

All animal studies were approved by Auvergne Ethics Committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare. Mice were culled by decapitation at the end of experiments. Tissues were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### Generation of transgenic mice

Transgenic mice were generated by additive transgenesis. Before micro-injection, the 0.5 *Akr1b7*:Igf2 and 4.5 *Sccl*:Igf2 transgenes were excised by *KpnI*/*HindIII* and *EcoRI*/*Sall* digestions, respectively. The resulting linearized fragment was injected into fertilised B6D2 mouse oocytes. Detection of transgenic founders and determination of copy numbers were performed by southern blotting. Eight and three founders were generated for the 0.5 *Akr1b7*:Igf2 and 4.5 *Sccl*:Igf2 lines, respectively (Figure S1). Founders F0-10, F0-20 and F0-22 transmitted the 0.5 *Akr1b7*:Igf2 transgene to their offspring. Founders F0-14 and F0-19 transmitted the 4.5 *Sccl*:Igf2 transgene. Semi quantitative RT-PCR analyses were used to select the lines with the most specific expression pattern and highest expression levels in the adrenal gland. Lines F0-20 (0.5 *Akr1b7*:Igf2) and F0-19 (4.5 *Sccl*:Igf2) were selected for further experiments. The line bearing the 0.5 *Akr1b7*:Igf2 transgene will be referred to as AdIgf2 throughout this manuscript. The line bearing the 4.5 *Sccl*:Igf2 transgene will be referred to as Sccl:Igf2.  $\Delta$ Cat mice were previously described [24]. They were generated by mating *Catnblox*<sup>(ex3)</sup> mice [25] with 0.5 *akr1b7*:Cre mice [24].  $\Delta$ Cat;AdIgf2 and  $\Delta$ Cat;Sccl:Igf2 lines were generated by mating  $\Delta$ Cat mice with AdIgf2 and Sccl:Igf2 transgenic lines respectively.

### Treatment with ACTH

Twelve month-old mice were treated chronically with intramuscular injections of 1.2 units of Synacthene Retard (tetracosactide complexed with zinc chloride, Sigma-Tau Laboratories) every other day, for two months.

### Reverse-transcription quantitative PCR

Frozen tissues were disrupted in Nucleospin RNA II lysis buffer (Macherey Nagel) using the Tissue-Lyser system (Qiagen). Total mRNAs were extracted using the NucleoSpin RNA II kit, according to manufacturer's instructions. Five hundred ng of mRNAs were reverse transcribed for 1 hour at 42°C with 5 pmol of random hexamer primers (U1240; Promega), 200 units reverse transcriptase (M1701; Promega), 2mM dNTPs and 20 units RNasin (N2615; Promega). Igf1r and 36b4 were amplified by





standard PCR with 1.5 units of GoTaq polymerase (M8305; Promega), 2mM of MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM of dNTPs and 10pmol of forward and reverse primers (Igf1R fwd-5' GA-GAAATTTGTGGGCCCCGGCATTGA and rev -5'GCATC-CAAGATGAGAGACCAGTCTA; 36b4 fwd-5' GTCACCTGTGCCAGCTCAGAA and rev-5' TCAATGGTGCCTCTGGAGAT). Igf1R amplification was carried out using the following conditions: 94°C, 30 s; 68°C, 30s; 72°C, 30s for a total of 30 cycles. 36b4 was amplified using the following protocol: 94°C, 30 s; 60°C, 30s; 72°C, 30 s for 30 cycles. Gene expression levels were measured by real-time quantitative PCR (RTqPCR) using either probes from the Taqman gene expression assays pool (Applied Biosystems) or SYBR green and standard PCR primers. In either case, 2 µl of diluted cDNAs (1/40) were used as a template in each PCR reaction. For Taqman analyses, each reaction was performed in duplicate in a final volume of 15µl with 0.75 µl of the appropriate probe mix and 7.5µl of PCR Mastermix (Precision, Inc., Primerdesign.co.uk). For SYBR Green analyses, each reaction was performed in duplicate in a final volume of 25µl with 12.5µl of MESA Green qPCR mix (Eurogentec) and 10 pmol of forward and reverse primer. Relative mRNA accumulation was determined by the  $\Delta\Delta C_t$  method with *peptidylprolyl isomerase B (ppib)* as a standard for Taqman analyses and with *36b4* as a standard for SYBR Green analyses. Unless otherwise stated, statistical analysis was performed with Student's *t*-test. Taqman gene expression assay probes that were used in the study are: *Ppib* Mm00478295\_m1, *Gli1* Mm004494645\_m1, *Patched1* Mm00436026\_m1, *Pod1* Mm00448961\_m1, *Shh* Mm00436527\_m1, *Axin2* Mm00443610\_m1, *Lef1* Mm00550265\_m1, *Vegf-A* Mm01281449\_m1, *Nov/Ccn3* Mm00456855\_m1, *Connexin- $\alpha$ 43* (*Gja1*) Mm00439105\_m1. Primer sequences for genes studied with SYBR Green are: 36b4 Fwd-5' GTCACCTGTGCCAGCTCAGAA and 36b4 Rev: 5' TCAATGGTGCCTCTGGAGAT; *Cyclin D1* Fwd: 5' TCTCCTGCTACCGCACAAAC and *Cylin D1* Rev: 5' TTCCTCCACTTCCCCCTC.

## Histology and immuno-histochemistry

Adrenals were fixed in 4% paraformaldehyde overnight. After two washes in PBS, adrenals were dehydrated through an ethanol gradient and incubated for two hours in Histoclear (HS200; National diagnostics). They were then embedded in paraffin and 5 µm sections were cut. For evaluation of general morphology, sections were stained with haematoxylin and eosin on a Microm HMS70 automated processor (Microm Microtech, France), according to standard procedures. Immunodetection of Igf2 1/100 (ab9574, Abcam), phospho-S6 1/250 (2217, Cell signaling), phospho-S6Kinase 1/100 (Ab32359, Abcam), GATA4 1/50 (SC1237, Santa Cruz),  $\beta$ -catenin 1/1000 (610153, BD Biosciences Pharmingen) Dab2 1/1000 (610464, BD Biosciences), Akr1b7 1/200 [26], Sf-1 1/1000 (a kind gift of Dr Ken Morohashi, Fukuoka, Japan) and Ki-67 1/1000 (RM-9106, Thermo Fisher Scientific) were carried out on an Intavis InSitu Pro VSi automated processor (Intavis AG, Germany).

For immunohistochemical analyses, antigen retrieval was performed by boiling rehydrated sections in sodium citrate 10 mM pH 6 tween 0.05% for 20 min, with the exception of Sf-1 and GATA4, which were detected after 20 min boiling in Vector Antigen Retrieval Solution (H3300, Vector Labs). Primary antibodies were detected with the appropriate secondary antibodies, coupled to biotin (1/500, Jackson ImmunoResearch). Biotin was then complexed with streptavidin coupled to Horse Radish Peroxidase (HRP) (016–030–084, Jackson ImmunoResearch). HRP activity was detected with the chromogenic substrate Novared

(SK4800, Vector Labs). The double staining for Dab2 and Akr1b7 was obtained following a similar protocol. The two proteins were sequentially detected by amplification with TSA-Alexa555 (Molecular Probes) and TSA-Alexa488 (Molecular Probes) fluorescent HRP substrates. To avoid cross-reaction, HRP was inactivated by incubation with 0.02% HCl for 20 min after detection of the first antibody.

## In situ hybridisation

Paraffin-embedded tissues were cut as 10 µm sections on Superfrost Plus slides. In situ hybridisation was conducted according to a standard protocol [27].

## Evaluation of cell proliferation

In smaller adrenals, Ki67-positive cells were counted on the entire adrenal surface. The number of cells was corrected to section surface and was expressed as a percentage of one of the wild-type control adrenals. Counting was performed separately in the cortex and medulla. Results represent the mean of at least 6 individual counts  $\pm$  standard deviation. In larger tumours, proliferation index was evaluated by counting Ki67-positive cells in five high power field pictures (x40 magnification) for each individual tumour. This was then expressed as a percentage of the total cell count for each field. For each individual adrenal, results were expressed as the mean of counts in five independent fields.

## Results

In order to induce overexpression of Igf2 in steroidogenic cells of the adrenal cortex we developed transgenic mice in which mouse Igf2 expression was driven by 500 bp of the regulatory regions and 3.5 kb of the intronic regions of the Akr1b7 gene (Figure S1A). This regulatory element has been previously shown to induce transgene expression in steroidogenic cells of the cortex starting at E14.5 [28]. Three transgenic lines differing by the genomic insertion site and copy numbers were generated (Figure S1B). Line 20, which showed highest expression in the adrenal by RT PCR (data not shown) was kept for further studies. It will thereafter be referred to as AdIgf2. We also generated a second transgenic line in which Igf2 expression was driven by 4.5 kb of the regulatory regions of the human P450SCC gene. This transgene allows expression from E11.5 in steroidogenic cells of both the adrenal cortex and the gonad [29]. Out of the two established lines, we selected line 19 in which expression in the adrenal was highest (Figure S1B and data not shown). These mice will be referred to as Sc:Igf2 line. They have been used as a control in order to confirm that the phenotypes observed in AdIgf2 adrenals were actually resulting from Igf2 overexpression and not from transgene insertion effects. The core of the experiments in the present manuscript has been conducted with females from the AdIgf2 transgenic line.

Further characterisation of the AdIgf2 transgenic line by RTqPCR showed a 6.8-fold increase in Igf2 in the adrenal cortex of transgenics compared with WT (Figure 1A). There was no significant overexpression in the other tissues tested, confirming the specificity of transgene activity. Igf2 expression was then assessed in situ by immunohistochemistry. Igf2 was barely expressed in the WT adrenal cortex (Figure 1B, a). In contrast, the protein was detected throughout the cortex, in virtually all steroidogenic cells of AdIgf2 adrenals (Figure 1B, b). Igf2 signals by binding to the Igf1-receptor and activates both the PI3K and MAPK pathways. RT-PCR showed expression of similar levels of Igf1r in WT and AdIgf2 adrenals (Figure S2A).



We then assessed the ability of Igf2 to induce signalling events in the adrenal cortex by analysing expression of the phosphorylated S6 protein. These experiments showed a basal level of S6 phosphorylation in WT adrenals with few cortical cells exhibiting cytoplasmic staining (Figure 1B, c). In contrast, AdIgf2 adrenals showed strong S6 phosphorylation in almost all steroidogenic cells of the cortex (Figure 1B, d). Similar observations were made for the upstream phosphorylated-S6Kinase (Figure S2B). Altogether, these experiments showed that AdIgf2 transgenic mice overexpressed Igf2, which resulted in increased Igf2 signalling in the adrenal cortex.

The effect of Igf2 overexpression on cortical organisation was then assessed by haematoxylin/eosin staining on sections from 10 month-old AdIgf2 adrenals. These experiments showed that the overall cord-like structure found in the zona fasciculata, was preserved in AdIgf2 adrenals (Figure 1C, b) compared with wild-type tissue (Figure 1C, a). However AdIgf2 adrenals were characterised by accumulation of large amounts of small basophilic cells at the periphery of the cortex, which in the most extreme cases, almost covered a third of cortical surface (Figure 1C, b black arrows). Most of these cells were elongated with scarce cytoplasm and resembled mesenchymal capsular cells (Figure 1C, b inset). Analysis of steroidogenic factor 1 (Sf-1, Figure 1C, d) and Akr1b7 (Figure 1C, f) expression showed that fasciculata cells maintained their molecular identity. Interestingly, the basophilic cells did not express Sf-1 (Figure 1C, d inset) or Akr1b7 (Figure 1C, f inset), indicating that they were undifferentiated. However, some but not all of these cells, expressed the transcription factor GATA4 (Figure S2 C, b) which was almost undetectable in wild-type adrenals (Figure S2 C, a). This was reminiscent of the spindle-shaped cells that accumulate at the cortical periphery in some strains of mice at the initiation of castration-induced neoplasia [30]. Disabled-2 (Dab2), a recently identified molecular marker of zona glomerulosa differentiation [31] was expressed under the capsule of wild-type adrenals (Figure 1C, g). In AdIgf2 adrenals, Dab2 was still expressed in the outer cortex. However, Dab2 expression domain was displaced inwards by accumulation of the undifferentiated basophilic cells (Figure 1C, h) that were negative for Dab2 expression (Figure 1B, h inset). Co-immunohistochemistry for Dab2 and Akr1b7 showed that the relative positions of zona glomerulosa (Dab2) and zona fasciculata (Akr1b7) were unaltered by Igf2 overexpression (Figure S2D). Altogether, these experiments suggested that Igf2 overexpression did not alter cortical architecture but that it induced accumulation of undifferentiated basophilic subcapsular cells. Absence of Igf2 (Figure 1D, a, black arrows) expression and S6 phosphorylation (Figure 1D, b, black arrows) in these cells suggested that their accumulation was triggered by indirect mechanisms that did not involve the PI3K/S6K pathway. Alternatively, this may reflect involvement of this pathway in the recruitment of these cells at an earlier time-point.

King and colleagues recently showed that adrenal cortex renewal occurred through recruitment of subcapsular progenitor cells in response to Shh signalling. Progenitors were undifferentiated (Sf-1 negative) and characterised by expression of Patched1 and Gli1. Shh was expressed by poorly differentiated Sf-1-positive cells localised in the vicinity of the zona glomerulosa [32]. The localisation, histological and molecular characteristics of the supernumerary mesenchymal subcapsular cells in AdIGF2 adrenals suggested that they could represent abnormally accumulated progenitors. Indeed, RTqPCR analysis showed markedly increased expression of both Gli1 and Ptch1 in 10 month-old AdIgf2 compared with wild-type adrenals (Figure 1E). Pod1, another putative marker of adrenal progenitor cells was also significantly

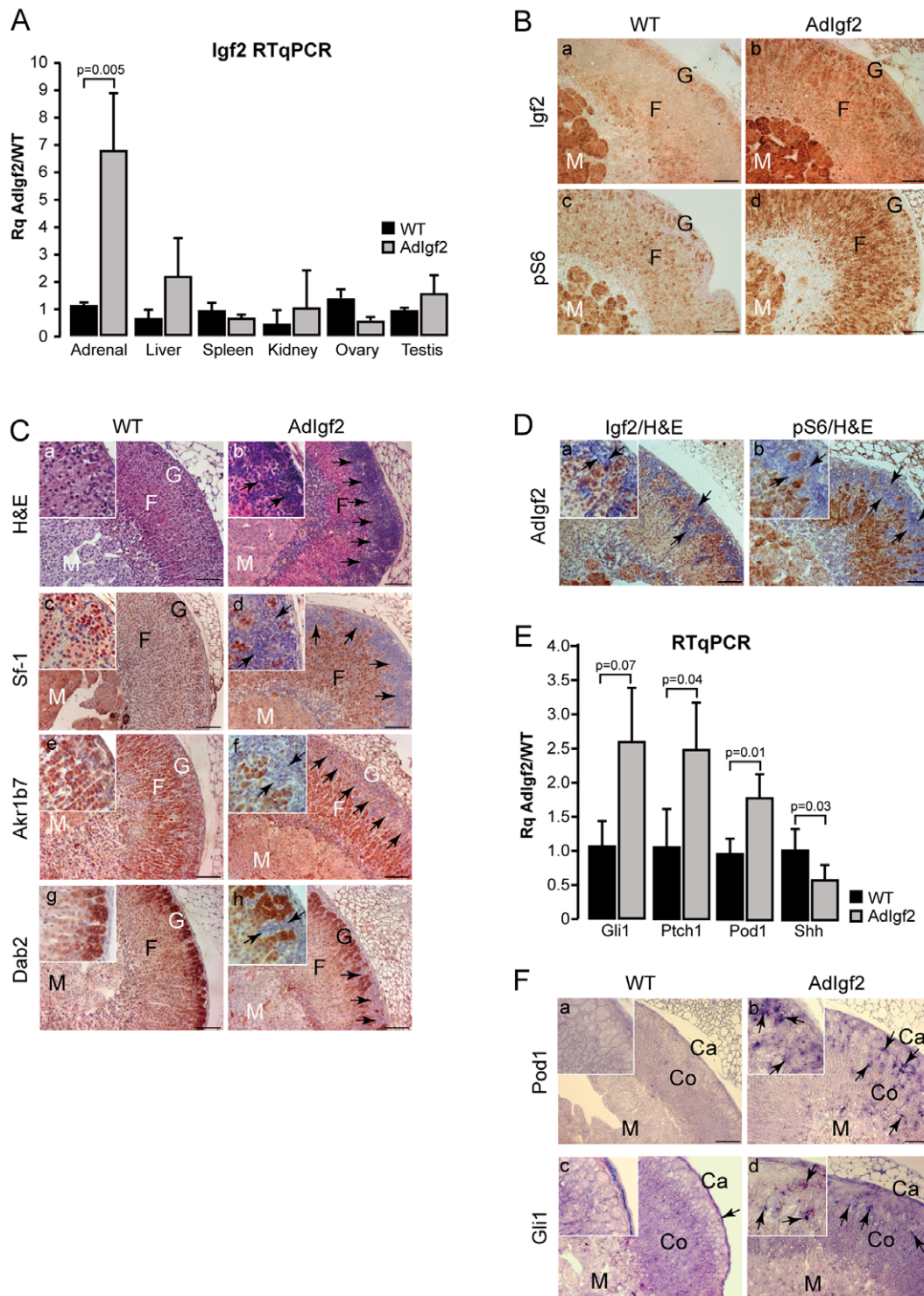
upregulated in AdIgf2 adrenals (Figure 1E). These observations were further substantiated by the presence of increased Pod1 and to a lesser extent Gli1 in situ hybridisation staining in the outer cortex and capsule of AdIgf2 adrenals (Figure 1F, b, d) compared with wild-type (Figure 1F, a, c). Surprisingly though, Shh expression was significantly decreased (Figure 1E), suggesting that accumulation of progenitors in response to Igf2 overexpression was independent of Hedgehog signalling.

In order to confirm that these effects were strictly dependent on Igf2 over-expression, similar experiments were performed on Scc:Igf2 transgenic mice in which Igf2 expression was driven by P450SCC regulatory regions (Figure S1). RTqPCR analysis showed that Scc:Igf2 mice expressed levels of Igf2 that were slightly higher than in AdIgf2 adrenals (10–11 fold Figure S3A). Igf2 overexpression through P450SCC regulatory regions also induced phosphorylation of S6 (Figure S3B) and resulted in accumulation of progenitor cells albeit at a later timepoint (Figure S3C&D). Altogether these data showed that Igf2 overexpression in the adrenal cortex of transgenic mice did not alter adrenal architecture but induced accumulation of undifferentiated progenitor cells, independently of Shh expression.

Molecular analyses on cell culture models suggested that Igf2 signalling could be involved in the stimulation of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. This crosstalk was assumed to play a role in the potential oncogenic effects of Igf2 [33–37]. We have recently shown that  $\beta$ -catenin is an adrenal oncogene involved in tumour initiation in the adrenal cortex [14]. Therefore, we wanted to investigate a potential involvement of Igf2 in Wnt signalling stimulation in the adrenal cortex. Nucleo-cytoplasmic staining of  $\beta$ -catenin is the gold standard in histological evaluation of canonical Wnt signalling. We thus analysed  $\beta$ -catenin expression by immunohistochemistry (Figure 2A). Adrenals from  $\Delta$ Cat mice in which  $\beta$ -catenin is constitutively activated were included as a control [14]. In the wild-type adrenal, nucleo-cytoplasmic  $\beta$ -catenin accumulation was restricted to zona glomerulosa (Figure 2A, a inset, white arrowheads). As previously published [14],  $\Delta$ Cat adrenals showed nucleo-cytoplasmic  $\beta$ -catenin staining throughout the cortex and within steroidogenic cells that invaded the medulla (Figure 2A, b inset). In contrast, nucleo-cytoplasmic  $\beta$ -catenin staining was restricted to zona glomerulosa in AdIgf2 adrenals (Figure 2A, c inset), although Igf2 was overexpressed throughout the cortex (Figure 1B, b). As shown in Figure 1, zona glomerulosa was displaced inwards by the accumulation of basophilic subcapsular cells (Figure 2A, d inset). Altogether, these observations suggested that Igf2 overexpression did not cause canonical Wnt pathway stimulation in the adrenal cortex. In order to confirm this hypothesis, we analysed expression of two  $\beta$ -catenin target genes by RTqPCR. As expected, expression levels of both Axin2 and Lef1 were markedly increased in  $\Delta$ Cat adrenals (Figure 2B). In contrast, overexpression of Igf2 did not alter expression of either target genes (Figure 2B). We thus concluded that Igf2 overexpression did not result in canonical Wnt signalling stimulation in the adrenal cortex.

IGF2 overexpression is found in almost all adrenal carcinomas compared with adrenal adenomas or healthy adrenals [8,9]. This suggests that Igf2 may be involved in carcinogenic transformation in the adrenal. We thus evaluated proliferation in 10 month-old AdIgf2 adrenals by counting the number of cells expressing Ki67 (Figure 2C). These experiments showed a modest but significant increase in Ki67-positive cells in the cortex of AdIgf2 mice compared with wild-type adrenals, whereas proliferation was unaltered in the medulla (Figure 2D). Increased Ki67 staining was randomly distributed throughout the cortex and was not associated with accumulating progenitor cells (data not shown).





**Figure 1. Characterisation of Adlgf2 transgenic mice adrenals.** **A- Igf2 is overexpressed in the adrenals of transgenic mice.** Igf2 expression was analysed by RTqPCR on cDNAs from adrenals, kidneys, liver, spleen, ovaries and testes of 10 month-old wild-type (WT) and Adlgf2 transgenic mice. Bars represent the mean relative quantification (Rq Adlgf2/WT) of Igf2 expression for each tissue in at least 4 samples per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **B- Igf2 signalling is increased in Adlgf2 adrenals.** Expression of Igf2 (a–b) and of the phosphorylated ribosomal protein S6 (c–d) was analysed by immunohistochemistry in WT and Adlgf2 adrenals. **C- Effect of Igf2 overexpression on adrenal histology and differentiation.** Histology was analysed by haematoxylin & eosin staining in wild-type (a) and Adlgf2 (b) adrenals. Expression of Sf-1 (c–d), Akr1b7 (e–f) and Dab2 (g–h) was analysed by immunohistochemistry in WT and Adlgf2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **D- Igf2 and phospho-S6 are not expressed in subcapsular mesenchymal cells.** Igf2 (a) and phospho-S6 (b) were immunodetected in Adlgf2 adrenals and the tissue was counterstained with haematoxylin. **E- Adrenal progenitor cells markers are overexpressed in Adlgf2 adrenal.** Expression of the progenitor cells markers, Gli1, Ptch1, Pod1 and Shh was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT) and Adlgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Adlgf2/WT) of gene expression for each



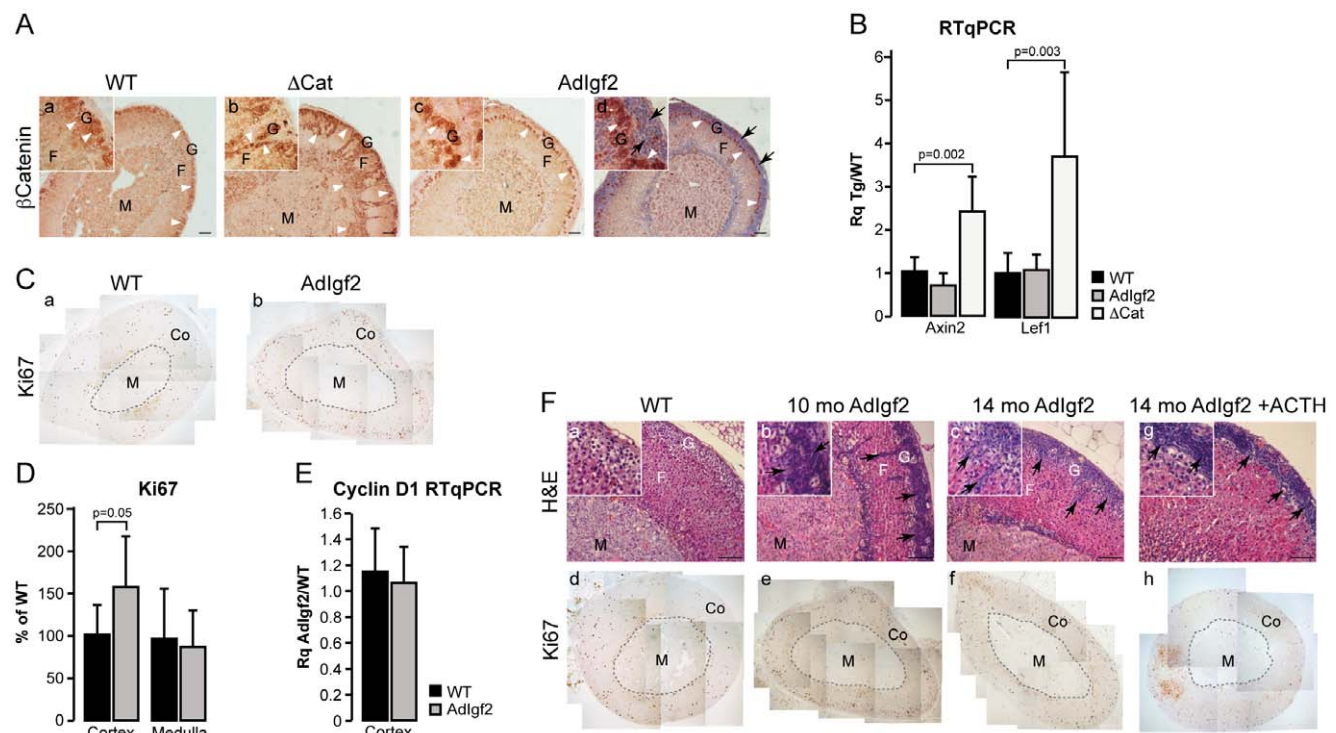
marker in at least 6 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **F- Pod1 and Gli1 are overexpressed in Adlgf2 adrenals.** Pod1 and Gli1 expression domains were analysed by in-situ hybridisation in wild-type (a, c) and Adlgf2 (b, d) adrenals. In all panels, arrows show mesenchymal subcapsular cells. M, medulla; F, fasciculata; G, glomerulosa; Co, cortex; Ca, capsule. Scale bar is 80  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0044171.g001

This modest increase in proliferation was not associated with increased Cyclin D1 expression as measured by RTqPCR, which was in agreement with the absence of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling stimulation (Figure 2E). Analysis of adrenal histology (Figure 2F, a–c) and Ki67 expression (Figure 2F, d–f) in 14 month-old adrenals showed that there was no progression of the adrenal phenotype over time. These observations suggested that Igf2 overexpression was not sufficient to trigger adrenal cortex tumourigenesis. However, Igf2 overexpression in this setup was mild (6.8 fold) compared to overexpression in ACC patients (from 10 to 1000 fold). We thus took advantage of the sensitivity to ACTH of the transgenic construct to increase Igf2 expression. For these experiments, 12 month-old Adlgf2 mice were treated three

times a week with 1.2 units of long acting ACTH for two months. This resulted in an  $87 \pm 4$  fold increase in Igf2 expression as measured by RTqPCR (Figure S3E). As expected, chronic ACTH exposure caused marked hypertrophy of cortical cells (Figure 2F, g) compared with both wild-type (Figure 2F, a) and untreated Adlgf2 adrenals (Figure 2F, b–c). However, the marked increase in Igf2 expression had no obvious effect on either cortical organisation (Figure 2F, g) or proliferation as measured by Ki67 expression (Figure 2F, h). Altogether, these data strongly suggested that Igf2 overexpression alone could not trigger tumour development in the adrenal cortex.

In ACC patients, IGF2 overexpression is frequently associated with constitutive activation of  $\beta$ -catenin. This suggests that



**Figure 2. Igf2 overexpression does not initiate adrenal tumourigenesis.** **A-  $\beta$ -catenin is not activated in Adlgf2 adrenals.**  $\beta$ -catenin expression was analysed by immunohistochemistry in wild-type (WT, a),  $\Delta$ Cat (positive control, b) and Adlgf2 (c–d) adrenals. Section in c was counterstained with haematoxylin. Nucleo-cytoplasmic staining of  $\beta$ -catenin (white arrowheads) is restricted to zona glomerulosa in WT and Adlgf2 adrenals but spreads throughout the cortex and inside the medulla in  $\Delta$ Cat adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **B- Wnt pathway is not activated in Adlgf2 adrenals.** Expression levels of Axin2 and Lef-1, two canonical Wnt pathway targets, were determined by RTqPCR with cDNAs from wild-type, Adlgf2 and  $\Delta$ Cat (positive control) adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each gene in at least 6 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **C- Analysis of Ki67 expression.** Ki67 was detected by immunohistochemistry on wild-type (WT, a) and Adlgf2 adrenals (b). **D- Proliferation is not increased in Adlgf2 adrenals.** Numbers of Ki67-positive cells in a whole adrenal section were counted separately in the cortex (Co) and medulla (M). For each zone, the number of cells was corrected for surface and is expressed as a percentage of Ki67-positive cells in one of the control individuals. Bars represent the mean of at least 7 individual counts in wild-type and Adlgf2 adrenals  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **E- Cyclin D1 expression is not increased in Adlgf2 adrenals.** Expression of Cyclin D1 was analysed by RTqPCR with cDNAs from Wild-type and Adlgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Adlgf2/WT) of gene expression in at least 5 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **F- Igf2 overexpression does not induce adrenal tumour formation.** The phenotype of Adlgf2 adrenals was followed over a 14 months time course by haematoxylin & eosin staining (b–c) and immunohistochemistry for Ki67 (e–f). A 10 month-old wild-type adrenal was included as a reference (WT, a, d). Some twelve month-old Adlgf2 mice were treated with ACTH for two months in order to increase Igf2 expression. Adrenal histology and proliferation were then assessed by haematoxylin & eosin staining (g) and Ki67 immunohistochemistry (h). Arrows show mesenchymal subcapsular cells. M, medulla; F, fasciculata; G, glomerulosa; Co, cortex. Scale bar is 80  $\mu$ m.





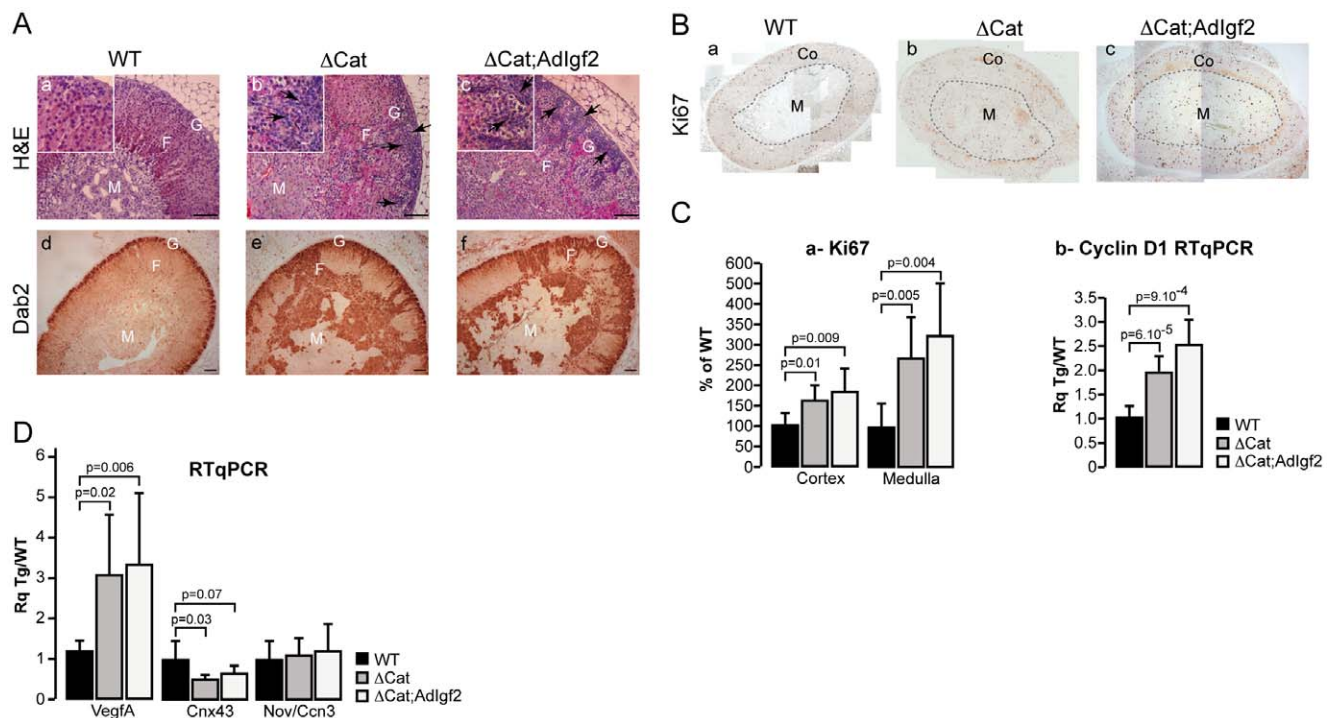
alterations in both pathways may accelerate malignant tumour progression. We thus tested this hypothesis by mating  $\Delta$ Igf2 mice with  $\Delta$ Cat mice to generate  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 compound transgenics. Our initial analysis focused on 10 month-old mice for which we previously generated most of our data. As expected, constitutive activation of  $\beta$ -catenin through deletion of the third exon of the *Ctnnb1* gene, resulted in benign adrenal hyperplasia, accumulation of basophilic sub-capsular cells (Figure 3A, b inset, black arrows) and ectopic differentiation of zona glomerulosa cells, shown by expansion of the domain of Disabled2 (*Dab2*) expression throughout the cortex and inside the medulla (Figure 3A, e). Surprisingly, overexpression of *Igf2* in the context of constitutive  $\beta$ -catenin activation did not significantly alter adrenal histology (Figure 3A, c) or *Dab2* expression (Figure 3A, f and Figure S4) in the majority of double transgenics when compared with  $\Delta$ Cat mice. The moderate effect of *Igf2* overexpression in a  $\Delta$ Cat context was also observed by histological analysis of compound transgenics in which *Igf2* was overexpressed through P450SCC regulatory regions ( $\Delta$ Cat;*Sc-c:Igf2*, Figure S5). Analysis of the proliferative parameters by Ki67 staining, showed that the number of proliferating cells was significantly increased in the cortex and medulla of  $\Delta$ Cat (Figure 3B, b & Figure 3C, a) and  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 (Figure 3B, c & Figure 3C, a) adrenals when compared with wild-type (Figure 3B, a & Figure 3C, a). However there was no significant difference between the two genotypes (Figure 3B & C, a). This was further corroborated by RTqPCR analysis of Cyclin D1 expression (Figure 3C, b). Altogether, these experiments suggested that there was no major acceleration of tumour development upon overexpression of *Igf2* in the context of constitutive  $\beta$ -catenin activation in 10 month-old adrenals. In order to confirm these observations, we analysed expression of three markers associated with malignancy in ACC patients (Figure 3D). Expression of *Vegf-A* was significantly increased in both  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 adrenals. However, there was no further significant increase in  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 when compared with  $\Delta$ Cat adrenals. Absence of an additive effect of *Igf2* was also confirmed for connexin-alpha 43 (*Cnx43*) for which there was a similar down-regulation in both genotypes. In contrast with our previous analysis of 18 month-old  $\Delta$ Cat adrenals [14], we did not observe an alteration of *Nov/Ccn3* expression upon constitutive activation of  $\beta$ -catenin in 10 month-old mice. Again, overexpression of *Igf2* had no impact on *Nov/Ccn3* expression (Figure 3D). Collectively, these data suggested that *Igf2* did not cooperate with  $\beta$ -catenin in the early steps of adrenal cortex tumourigenesis.

We then evaluated a possible cooperation at later stages by analysing 14 month-old transgenic mice. At this stage,  $\Delta$ Cat mice showed quite homogenous signs of tumour progression. Cortical dysplasia was evident (Figure 4A, b) and the cortex was mostly composed of glomerulosa cells as shown by *Dab2* staining (Figure 4A, f). Fasciculata differentiation, analysed by *Akr1b7* immunohistochemistry (Figure 4A, j), was also altered when compared with wild-type (Figure 4A, i). However there were no obvious signs of malignant progression. Consistent with these histological observations, Ki67 labelling index (Figure 4A, n) was increased when compared with wild-type mice but only one individual exceeded the 5% threshold considered as a marker of malignancy in patients [38] (Figure 4B, a). Anatomic-pathological evaluation showed that 4/5  $\Delta$ Cat adrenals had a Weiss score of 0 and 1/5 had a Weiss score of 1 resulting from a marked decrease in the number of clear cells and accumulation of compact cells (Figure 4C & Figure S7). Histological analysis of  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 adrenals showed a broader range of phenotypes.

Compound transgenics had histological features reminiscent of 14 month-old  $\Delta$ Cat adrenals, characterised by massive cortical dysplasia (Figure 4A, c–d), accumulation of basophilic spindle-shaped cells (Fig 4Ac) and cortical and medullary invasion by *Dab2*-positive zona glomerulosa cells (Figure 4A, g–h). However, these features were generally exacerbated when compared with stage-matched  $\Delta$ Cat adrenals. Indeed, the majority of  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 adrenals (6/7) exhibited a Weiss score of 1 or above (Figure 4C,  $p = 0.01$  for Weiss  $\geq 1$  in Fisher's exact test), mostly characterised by prominent anisokaryosis and the presence of large nucleoli (Figure 4A, d, inset). One adrenal exhibited more profound alterations with both nuclear pleomorphism and the presence of mitoses (Weiss 2, Figure 4A, d, h, l, p). Small areas of oedematous remodelling (2/7) and leukocyte invasion (2/7) were also observed. In the most advanced tumours, *Dab2* (glomerulosa, Figure 4A, h) and *Akr1b7* (fasciculata, Figure 4A, l) were virtually undetectable, indicating loss of functional differentiation. The presence of these more aggressive features was correlated with increased Ki67 labelling index, which exceeded 20% in 2/7  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 adrenals (Figure 4A, p & Figure 4B, a). The relative acceleration of tumour progression in response to *Igf2* overexpression was also associated with a significant increase in Cyclin D1 expression in  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 when compared with  $\Delta$ Cat adrenals (Figure 4B, b), but did not result in further deregulation of malignancy markers expression (Figure S6 compared with Figure 3D). Altogether, these observations suggested that *Igf2* overexpression had a moderate but significant promoting effect on tumour progression in 14 month-old  $\Delta$ Cat mice. This was also confirmed in the independent  $\Delta$ Cat;*Sc-c:Igf2* compound transgenic line (Figure S7).

Adrenal tumour patients only show IGF2 overexpression in carcinomas but not adenomas. We thus decided to mimic this situation by further inducing *Igf2* expression in  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 adrenals, right before the onset of spontaneous aggressive tumour transition. For this, 12 month-old  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 transgenic mice were treated with ACTH for two months. This resulted in a further 3.5 fold increase of *Igf2* expression in adrenals from ACTH-treated  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 mice when compared with untreated animals (27 fold when compared with non transgenic animals, Figure S3E). As expected, this treatment did not induce *Igf2* expression in  $\Delta$ Cat mice (Figure S3E). Histological analysis showed that ACTH treatment resulted in marked cellular hypertrophy (Figure 4D, d–e) in both  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 adrenals. It also induced an exacerbation of the tumour phenotype in both genotypes. Indeed, all animals had at least a Weiss score of 2 (Figure 4C,  $p = 0.0022$  for  $\Delta$ Cat *vs*  $\Delta$ Cat + ACTH;  $p = 0.0047$  for  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 *vs*  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 + ACTH in Fisher's exact test). This score was associated with both accumulation of compact cells, marked nuclear pleomorphism and enlarged nucleoli in both genotypes (Figure 4D, d–e, insets, white arrowheads). However, all these features were much more obvious in  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 than in  $\Delta$ Cat adrenals. Large areas of oedematous remodelling (Figure 4D, b, c, f, g, dashed lines and inset in g) and leukocyte infiltration (Figure 4C) were also essentially observed in this group. One ACTH-treated  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 adrenal presented as an overt carcinoma *in situ* (Weiss 3) with diffuse architecture (Figure 4D, c) high grade nuclear alterations, oedematous remodelling (Figure 4D, f, dashed line) and large areas of necrosis (Figure 4D, f, inset). ACTH treatment also induced a significant increase in Ki67 labelling index in  $\Delta$ Cat adrenals compared with their untreated counterparts (Figure 4B, a). Although the increase in Ki67 index was not significant in the  $\Delta$ Cat; $\Delta$ Igf2 group it resulted in a slight shift upwards (mean 15% *vs* 11%) and in one adrenal showing a 34% index. Despite these aggressive features,





**Figure 3. Analysis of the cooperation between  $\beta$ -catenin activation and Igf2 overexpression in 10 month-old mice. A- Igf2 overexpression in 10 month-old  $\Delta$ Cat mice does not significantly alter the adrenal phenotype.** Adlgf2 mice were mated with  $\Delta$ Cat mice to generate  $\Delta$ Cat;Adlgf2 compound animals. The adrenal phenotype in 10 month-old mice was analysed by haematoxylin & eosin staining (a–c) and immunohistochemistry for Dab2. Black arrows show infiltrating subcapsular mesenchymal cells. **B- Analysis of Ki67 expression in 10 month-old  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals.** Ki67 expression was analysed by immunohistochemistry in wild-type (B, a),  $\Delta$ Cat (B, b) and  $\Delta$ Cat;Igf2 (B, c) adrenals. **C- Igf2 overexpression in  $\Delta$ Cat mice does not significantly increase proliferation. a-Counting of Ki67-positive cells.** Numbers of Ki67-positive cells in a whole adrenal section were counted separately in the cortex (Co) and medulla (M). For each zone, the number of cells was corrected for surface and is expressed as a percentage of Ki67-positive cells in one of the control individuals. Bars represent the mean of at least 7 individual counts in wild-type,  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **b- Analysis of Cyclin D1 expression.** Cyclin D1 expression was analysed by RTqPCR with cDNAs from wild-type,  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **D- Analysis of malignancy markers expression.** Expression of VegfA, Connexina43 (cnx43) and Nov/Ccn3 was analysed by RTqPCR with cDNAs from wild-type (WT),  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 7 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. M, medulla; F, fasciculata; G, glomerulosa. Scale bar is 80  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0044171.g003

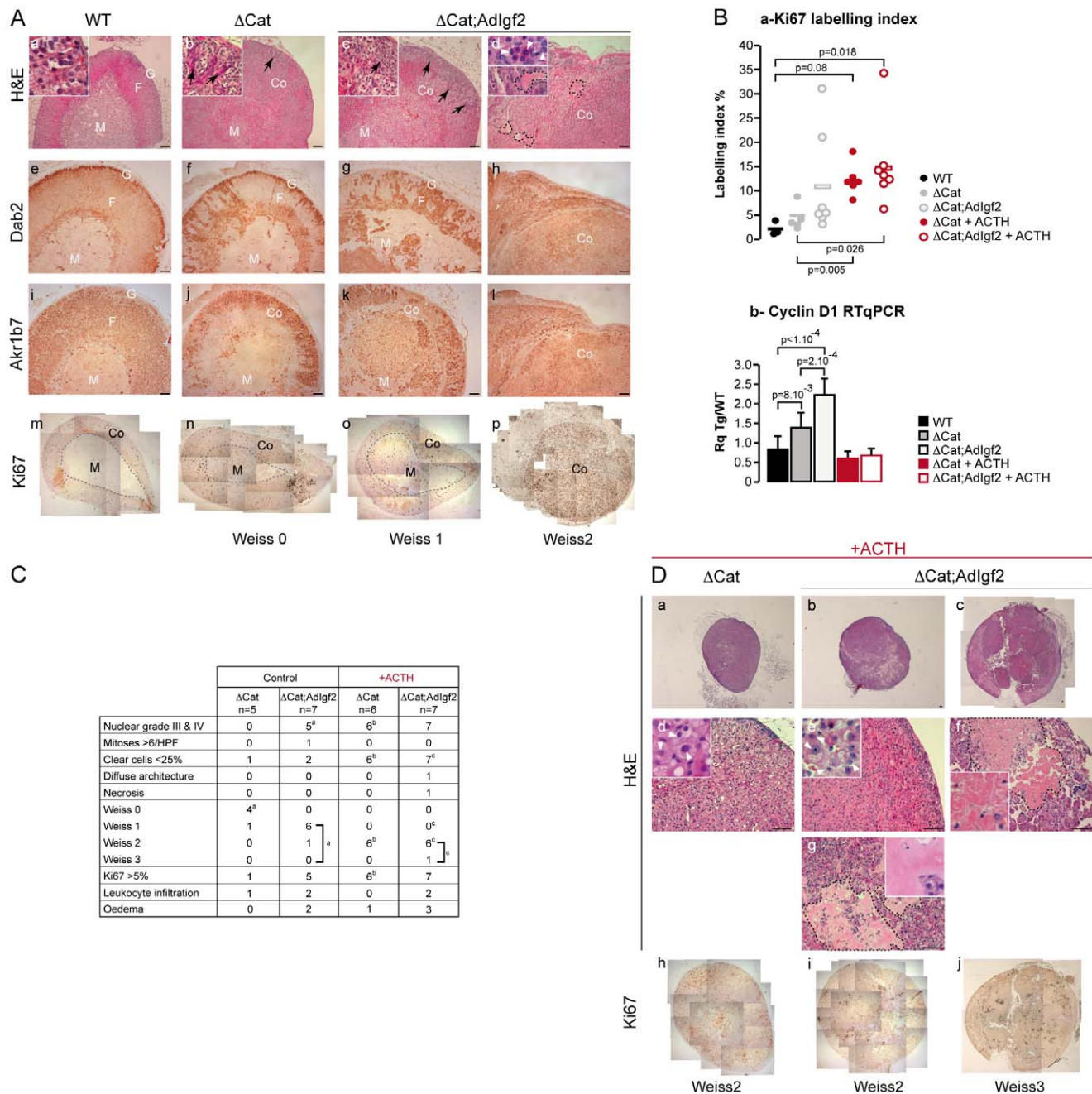
ACTH treatment resulted in a normalisation of Cyclin D1 expression in both  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals. From these experiments, we concluded that elevating Igf2 expression accelerated tumour progression and induced carcinoma in situ development in the context of constitutive  $\beta$ -catenin activation. However, ACTH also had an intrinsic effect on tumour progression in  $\Delta$ Cat adrenals even though Igf2 expression levels were not increased (Figure S3E).

## Discussion

Despite recent progress, the molecular mechanisms of malignant adrenal cortical tumour development still remain elusive. The growth factor IGF2 is overexpressed in almost all adrenal cortical carcinomas, suggesting that it may play a role in malignant adrenal tumour formation in patients [8–10,39]. Here, we show that overexpression of Igf2 from 7 to 87 fold over basal levels does not result in adrenal tumour formation in transgenic mice over 14 months, despite a mild increase in cortical cell proliferation (Figures 1 & 2). This indicates that Igf2 alone may stimulate adrenal cortical proliferation but that it is not able to induce oncogenic transformation. This observation is consistent with

previously published data, showing that a 4 to 6-fold elevation of serum IGF2 levels in PEPCK-IGF2 transgenic mice did not induce adrenal tumour development [23]. The absence of oncogenic activity of Igf2 in the adrenal gland of transgenic mice may seem surprising at first. However, most models of Igf2 overexpression do not develop tumours although they recapitulate developmental overgrowth alterations associated with BWS [21,22]. Interestingly though, about 20% of transgenic mice with overexpression of IGF2 under the control of the MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) promoter develop lung tumours after 6 months of age. This proportion rises to about 70% after 18 months [40]. This suggests that in this particular tissue IGF2 may behave as a weak oncogene. Surprisingly, the same transgenic mice do not show tumour development in the mammary epithelium, despite a 50 to 100-fold increase in IGF2 expression in their mammary glands and an inhibition of apoptosis during involution [41]. Therefore the oncogenic potential of Igf2 seems tissue-specific. Igf2 signalling relies on the IGF1R receptor, which can mobilise multiple intracellular pathways, including PI3K/AKT and MAP Kinases [42]. One hypothesis that could account for tissue-specific activity of Igf2 is the coupling of IGF1R signalling with distinct pathways, depending on the cell type. In





**Figure 4. Overexpression of Igf2 results in a mild acceleration of tumour progression in 14 month-old  $\Delta$ Cat adrenals.** **A- Histological analysis of the adrenal phenotype.** Adrenal phenotype in  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 mice was evaluated by haematoxylin & eosin staining (a–d) and by immunohistochemistry for Dab2 (e–h), Akr1b7 (i–l) and Ki67 (m–p). One column represents analysis of different sections from the same adrenal. Two  $\Delta$ Cat;Adlgf2 individuals showing the mildest (c, g, k, o) and worst (d, h, l, p) phenotypes were included. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. White arrowheads show regions of nuclear pelomorphism. Black dashed lines in d demarcate areas of oedematous remodelling. **B- Analysis of proliferation.** **a-** Ki67 labelling-index was determined by counting the number of Ki67-positive cells over the total number of cells in five representative 40X fields per adrenal. Each individual index was plotted. The bar represents the mean index value for each group.  $\Delta$ Cat + ACTH and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 + ACTH adrenals were obtained from 14 month-old  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 animals that were treated with ACTH for two months before culling. P-value was calculated using ANOVA followed by a post-hoc Fisher LSD test. **b-** Cyclin D1 expression was analysed by RTqPCR with cDNAs from wild-type,  $\Delta$ Cat,  $\Delta$ Cat;Adlgf2,  $\Delta$ Cat + ACTH and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 + ACTH adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. P-value was calculated using ANOVA followed by a post-hoc Fisher LSD test. **C- Determination of the Weiss score.** Weiss score was determined by a trained pathologist, using the criteria defined by Weiss for human adrenal tumours. The table only shows the criteria that were observed in our cohort. The table also includes the number of animals showing a Ki67 index above the critical 5% threshold as well as leukocyte infiltration and occurrence of oedematous remodelling. Statistical analysis was performed by a Fisher Exact Test. Exponent letters correspond to statistically significant differences ( $p < 0.03$ ) between control  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals (a), control and ACTH-treated  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals (b) and control and ACTH-treated  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals (c). Some values had to be considered as a group, to reach significance in the paired comparisons (brackets). **D- Histological analysis of  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 adrenals in ACTH-treated animals.** Twelve month-old  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlgf2 mice were treated for two months with ACTH before culling. Their



adrenals were then analysed by haematoxylin & eosin staining (a–g) and proliferation was evaluated by Ki67 staining (h–j). One column represents analysis of a single adrenal. Two  $\Delta$ Cat;AdIgf2 + ACTH individuals showing the mildest (b, e, g, i) and worst (c, f, j) phenotypes were included. Pictures in d, e, f and g represent high magnification details of the corresponding adrenals in a, b and c. White arrowheads show areas of nuclear pleomorphism. Black dashed lines demarcate areas of oedematous remodelling (g) and necrosis (f). M, medulla; Co, Cortex; F, fasciculata; G, glomerulosa. Scale bar is 80  $\mu$ m.  
doi:10.1371/journal.pone.0044171.g004

this respect, one interesting observation is that in various cell lines in culture, mobilisation of the Igf1 receptor by Igf2, Igf1 or insulin can stimulate Wnt signalling, through inhibition of GSK3 $\beta$  [33] or phosphorylation and activation of  $\beta$ -catenin [34–37]. These mechanisms were proposed to account for some of the oncogenic activities of Igf2 and would be particularly relevant for the adrenal, as we previously showed that  $\beta$ -catenin was a *bona fide* oncogene in the adrenal cortex [14]. However, our analysis of  $\beta$ -catenin expression by immunohistochemistry, and of Wnt target genes expression by RTqPCR, failed to show activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in Igf2 transgenic adrenals (Figure 2). It is therefore tempting to speculate that the absence of oncogenic activity of Igf2 in the adrenal may result, at least in part, from its incapacity to activate canonical Wnt signalling in this particular tissue.

Although overexpression of Igf2 *per se* may have low oncogenic potential in transgenic mouse models, there is ample evidence that Igf2 can cooperate with other pathways to accelerate tumour progression. This has been particularly well established for Wnt-dependent carcinogenesis in the colon. Indeed, increasing Igf2 levels through LOI (heterozygous deletion of H19) or with a keratin 10 promoter increases the number and size of colon adenomas as well as malignant progression in APC<sup>Min/+</sup> mice [43–45]. Conversely, the reduction of Igf2 expression resulting from deletion of the transcriptionally active paternal allele or from the use of a soluble form of the scavenger IGF2R receptor, is associated with reduced number of adenomas and decreased malignant progression [44,45]. Similar observations were also made in hedgehog/patched-dependent medulloblastomas and rhabdomyosarcomas [46,47]. In malignant adrenal cortical tumours, the second most frequent alteration after IGF2 overexpression is constitutive activation of  $\beta$ -catenin [11,13]. Carcinomas that developed with low frequency in  $\Delta$ Cat mice never showed spontaneous overexpression of Igf2 (14 and unpublished observations). Here, we decided to mimic the genetic context of human ACC by mating  $\Delta$ Cat mice with both AdIgf2 and Sccl:Igf2 transgenic mice. Our analysis initially focused on the comparison of 10 month-old  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIgf2 or  $\Delta$ Cat;Sccl:Igf2 compound transgenics. At this stage,  $\Delta$ Cat mice only developed benign adrenal hyperplasia and dysplasia (14 and this manuscript). Analyses of proliferation, differentiation and expression of malignancy markers showed that overexpression of Igf2 in this context had no significant effect on tumour development (Figure 3). This suggests that Igf2 overexpression is dispensable in the early stages of adrenal tumour development, which is consistent with the low expression of IGF2 in human ACA [9]. We thus evaluated the effect of Igf2 at a later time-point by analysing 14 month-old  $\Delta$ Cat and compound transgenic adrenals. Although there was still heterogeneity in tumour presentation in both  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIgf2 adrenals at this stage, histopathological analysis showed an almost systematic acceleration of tumour progression in the adrenals that overexpressed Igf2 (Figure 4). Indeed, a vast majority (6/7) of the tumour tissue from  $\Delta$ Cat;AdIgf2 mice had a Weiss score of 1 whereas the majority of  $\Delta$ Cat adrenals (4/5) displayed features consistent with a Weiss score of 0. This acceleration was associated with a significant increase in Cyclin D1 expression in  $\Delta$ Cat;AdIgf2 *vs*  $\Delta$ Cat adrenals

and in a large increase in Ki67 labelling index (>20%) in 2/7 adrenals. However, there was still no significant alteration of malignancy markers expression and no overt signs of malignant progression. Overall, these observations show that Igf2 has the potential to accelerate adrenal cortex tumourigenesis. However, this effect is only significant in already advanced lesions and does not induce adrenal carcinoma development even in aged animals.

The mechanisms accounting for the late involvement of Igf2 in adrenal tumour progression are unclear. Similar observations were made in medulloblastomas. Indeed, genetic studies in mouse, showed that Igf2 was dispensable at early pre-cancerous stages but that it was required at later stages of tumour progression [47]. In vitro studies on adrenal carcinoma cell lines with increased IGF2 expression showed that blocking IGF1R activity resulted in both decreased proliferation and induction of apoptosis, indicating that IGF2 was involved in the control of both processes [19,20]. However, we have shown that proliferation and to some extent, malignant transformation, are independent of Igf2 expression in  $\Delta$ Cat adrenals [14]. This suggests that Igf2 overexpression may stimulate another essential process to accelerate tumour progression. Here, we show that Igf2 overexpression in the context of constitutive  $\beta$ -catenin activation results in marked anisokaryosis and appearance of multiple and enlarged nucleoli that are not seen in stage-matched  $\Delta$ Cat adrenals (Figure 4A). Nucleoli are associated with RNA translation, a process dependent on ribosome biogenesis and the protein S6 [48]. Interestingly we show that one of the readouts of Igf2 overexpression in the adrenal cortex is the phosphorylation of the ribosomal protein S6 (Figure 1B). It is therefore tempting to speculate that one of the effects of Igf2 overexpression in adrenal tumour progression is dependent on an increased translation capacity, resulting from phosphorylation and activation of the S6 protein. This seems particularly relevant in light of the recent finding that mTOR pathway is activated and involved in growth stimulation of paediatric adrenocortical carcinomas [49], tumour entities that are also associated with IGF2 overexpression [20].

One surprising finding of our study is the relatively modest effect of Igf2 overexpression on tumour progression in compound transgenics. One may argue that the levels of overexpression achieved in our models are insufficient to induce aberrant stimulation of the IGF signalling pathway. We attempted to overcome this issue by stimulating transgene expression with chronic ACTH exposure over 2 months. This resulted in a marked 27-fold elevation of Igf2 expression (Figure S3E), which was in the range of overexpression in ACC patients [9]. This resulted in overall aggravation of the tumour phenotype in  $\Delta$ Cat;AdIgf2 adrenals, with one tumour presenting as an overt carcinoma *in situ* (Weiss 3). Some  $\Delta$ Cat;AdIgf2 tumours were also characterised by large areas of oedematous remodelling. Although the significance of this finding is unclear, it is correlated with the observation of large cystic hemorrhagic adrenal lesions in BWS patients [50], suggesting that Igf2 overexpression is directly responsible for the development of oedematous alterations. Altogether, these observations suggest that further increasing the levels of Igf2 expression can accelerate tumourigenesis in the context of  $\beta$ -catenin activation. However, one caveat of these experiments is the observation that tumours in the  $\Delta$ Cat group





switch from Weiss 0 or 1 to Weiss 2 and show a significant increase in Ki67 labelling index after ACTH treatment (Figure 4). One may argue that ACTH treatment may indirectly (through elevation of *Akr1b7:Cre* expression) or directly (through pathway cross-talks [51]) stimulate  $\beta$ -catenin activity. However, this is unlikely as there was no significant increase in *Axin2* expression in  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIgf2 adrenals following ACTH treatment (Figure S8). Even though the role of ACTH on adrenal cells proliferation is still a controversial subject [52], our observations may thus reflect an intrinsic growth promoting effect of this hormone in this particular genetic setting. Interestingly, analysis of IGF pathway actors shows increased expression of IGFBP2 and of the IGF receptor IGF1R in AdIgf2,  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIGF2 adrenals following ACTH treatment (Figure S9). Increased expression of these two positive IGF signalling factors may account for increased proliferation in the different genetic backgrounds. This would be consistent with the observation that IGFBP2 promotes proliferation and cloning efficiency of Y1 adrenocortical cells in culture [53]. These observations further suggest that the growth promoting effect of ACTH could be dependent on increased IGF signalling, irrespective of the genetic context.

Collectively, our data show that IGF2 overexpression in the context of constitutive Wnt/ $\beta$ -catenin activation results in a moderate acceleration of tumour development but that it is not sufficient to trigger malignant tumour progression.

One interesting observation of our studies is the accumulation of Pod-1 positive subcapsular progenitor cells in the adrenal cortex of AdIgf2 transgenic mice (Figure 1). Adrenal cortex cell renewal normally occurs through the recruitment of mesenchymal subcapsular progenitor cells [54]. These are recruited by Sonic Hedgehog (Shh) produced by poorly differentiated steroidogenic cells, localised in the vicinity of adrenal zona glomerulosa. Upon stimulation by Shh, progenitor cells express the hedgehog receptor Patched 1 (*Ptch1*) and the transcription factor *Gli1* [32,55]. Our RTqPCR analyses show overexpression of *Ptch1* and *Gli1* as well as *Pod1*. This strongly suggests that Igf2 induces the recruitment of adrenal cells progenitors. A similar role has been attributed to Igf2 for cerebellar granule cell precursors [56,57] and for the mesenchymal progenitors of chondrocytes and osteoblasts [58]. Surprisingly, in AdIgf2 adrenals, Shh expression is downregulated (Figure 1). This suggests that the effect of Igf2 on adrenal progenitor recruitment is independent of Hedgehog signalling. In the cerebellum, Igf2 signalling can cooperate with Hedgehog to favour recruitment of cerebellar granule cell precursors. However, although Igf2 signalling is required for Hedgehog activity, Igf2 activity is independent of smoothened [56]. This suggests a cascade of signalling events in which Hedgehog, through *Ptch1* and *Gli1*, induces Igf2 expression, which in turn signals to progenitors to stimulate their recruitment. Consistent with this hypothesis, Igf2 has been shown to be downstream of Hedgehog signalling in pluripotent mesenchymal cells [24] as well as in medulloblastomas and rhabdomyosarcomas [46,47]. Based on these observations, it is tempting to speculate that Igf2 overexpression in the adrenal cortex bypasses hedgehog signalling to trigger progenitor cells recruitment. The use of *Akr1b7* regulatory regions makes it unlikely for Igf2 to be expressed in the same cells that normally express Shh or *Gli1* in the adrenal cortex. Consistent with this idea, Igf2 seems to be mostly expressed in differentiated cells of the cortex in AdIgf2 adrenals (Figure 1D). However, Igf2 is a diffusible factor that may act in a paracrine manner in this context. Interestingly, our unpublished analysis of  $\Delta$ Cat mice showed increased expression of *Ptch1* and *Gli1* in the adrenal cortex. However, in contrast with AdIgf2 transgenics, this

was accompanied by overexpression of Shh (A. Berthon, unpublished observations). This suggests that Wnt signalling may be situated at the top of the cascade involved in the recruitment of adrenal progenitors. These observations obviously have implications for normal adrenal homeostasis but also suggest that aberrant recruitment of progenitor cells, resulting from deregulated Wnt, Hedgehog or IGF signalling, may participate in the development of adrenal cortex tumours.

In conclusion, using two distinct transgenic mouse lines allowing overexpression of Igf2, we have shown that increased Igf2 expression is not oncogenic *per se* in the adrenal cortex. We have also shown that it has a significant but moderate effect on tumour progression in the context of  $\beta$ -catenin activation, suggesting that these two alterations are not sufficient to trigger malignant adrenocortical tumourigenesis. These observations raise the question of the efficacy of IGF signalling targeted therapies in the context of ACC. Further studies are warranted to broaden our understanding of the molecular mechanisms involved in the formation of adrenocortical carcinomas.

## Supporting Information

**Figure S1 Establishment of transgenic lines overexpressing Igf2. A- Transgene constructs.** The 0.5 *akr1b7:Igf2* transgene was constructed by cloning the full length mouse Igf2 cDNA (mIgf2) downstream of the *Akr1b7* promoter (−510/+44) and upstream of a 3.5 kb segment of *Akr1b7* intragenic regions, spanning intron 1 to intron 2 (*Akr1b7* intron 2.1). The 4.5 *Sccl:Igf2* transgene was constructed by cloning mouse Igf2 cDNA downstream of a 4.5kb segment of human P450SCC regulatory regions (hP450SCC promoter) pA: mini intron and polyadenylation signal of SV40 T antigen. **B- Founders and lines.** Transgene constructs were microinjected into pronuclei of fertilized oocytes and transferred to pseudopregnant females. The table summarizes the outcome of these experiments by showing the number and identification (Id) of founders. Transgene copy numbers were evaluated by southern-blotting. (TIF)

**Figure S2 A- Igf1r is expressed in the adrenal. Expression of Igf1 receptor (igf1r) was evaluated by RT-PCR with cDNAs from wild-type (WT) and transgenic adrenals (AdIgf2).** The positive control was composed of a mix of cDNAs from adrenals, testes, ovaries, spleen and liver. RT-PCR for 36b4 was included as a normalization reference. **B- S6Kinase phosphorylation is increased in AdIgf2 adrenals.** Expression of the phosphorylated S6Kinase was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells that are negative for phospho-S6Kinase staining. White arrowheads show negative cells in the wild-type adrenals. **C- GATA4 expression is increased in AdIGF2 adrenals.** Expression of GATA4 was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show GATA4-positive infiltrating cells. **D- Relative positions of zona glomerulosa and zona fasciculata are maintained in AdIgf2 adrenals.** Expression of *Akr1b7* (green, fasciculata) and *Dab2* (red, glomerulosa) was detected by co-immunohistochemistry on sections from wild-type and AdIgf2 adrenals. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80  $\mu$ m. (TIF)

**Figure S3 Characterisation of the adrenal phenotype in Sccl:Igf2 transgenic mice. A- Expression levels of Igf2 in the two transgenic lines.** Igf2 expression was analysed by



RTqPCR on cDNAs from 10 month-old wild-type, 0.5 AdIg2 and Scclg2 (10 and 14 month-old) adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq AdIg2/WT) of Igf2 expression for each tissue in at least 5 samples per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **B- Igf2 signalling is increased in Scclg2 adrenals.** Expression of the phosphorylated ribosomal protein S6 was analysed by immunohistochemistry in WT (a) and AdIg2 (b) adrenals. **C- Effect of Igf2 overexpression on adrenal histology and differentiation.** Histology was analysed by haematoxylin & eosin staining in wild-type (a), 10 month-old (b) and 14 month-old Scclg2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **D- Adrenal progenitor cells markers are overexpressed in Scclg2 adrenal.** Expression of the progenitor cells markers, Gli1 and Pod1 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT) and Scclg2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Scclg2/WT) of gene expression for each marker in at least 7 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **E- Expression of Igf2 after ACTH induction.** Twelve month-old  $\Delta$ Cat, AdIg2 and  $\Delta$ Cat;AdIg2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Igf2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 4 adrenals per genotype and per condition  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80  $\mu$ m. (TIF)

**Figure S4. Expression of Dab2 in 10 month-old  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIg2 adrenals.** Expression of the zona glomerulosa marker Dab2 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT),  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIg2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. (TIF)

**Figure S5 Analysis of the adrenal phenotype in 10 month-old  $\Delta$ Cat;Scclg2 mice.** Scclg2 transgenic mice were mated with  $\Delta$ Cat mice to generate  $\Delta$ Cat;Scclg2 compound transgenics. The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 10 month-old animals. Two  $\Delta$ Cat;Scclg2 individuals showing the mildest (c, d) and worst (e, f) phenotypes were included. Pictures in d and f and g represent high magnification details of the corresponding adrenals in c and e respectively. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. White dashed lines demarcate areas of compact cells accumulation. Accumulation of these cells in over 75% of the adrenal is considered as 1 point in Weiss score determination. Scale bar is 80  $\mu$ m. (TIF)

**Figure S6 Analysis of malignancy markers expression in 14 month-old  $\Delta$ Cat;AdIg2 adrenals.** Expression of VegfA, Connexin43 (cnx43) and Nov/Ccn3 was analysed by RTqPCR with cDNAs from 14 month-old wild-type (WT),  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIg2 adrenals. Bars represent the mean relative

quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 6 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. (TIF)

**Figure S7 Analysis of the adrenal phenotype in 14 month-old  $\Delta$ Cat;Scclg2 mice.** The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 14 month-old animals. Three different  $\Delta$ Cat;Scclg2 adrenals showing the range of phenotypes are presented (b-h). Pictures in f, g and h show high magnification details of pictures in b, c and d respectively. The adrenal in b and f is composed of a majority of compact cells (Weiss 1) delineated by white dashed lines. The adrenal in c and g is mostly composed of a central macro-nodule of spongiocytic cells, but only shows mild accumulation of compact cells (Weiss 0). The adrenal in d and h shows multiple areas of nuclear pleomorphism (white arrowheads, Weiss 1) and lymphocytic invasion (black arrowheads). Please note that the  $\Delta$ Cat adrenal in a and e also shows nuclear pleomorphism (Weiss 1), although overall cortical organisation is preserved. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. Scale bar is 80  $\mu$ m. (TIF)

**Figure S8 Expression of Wnt target gene Axin2 in  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIg2 adrenals after ACTH treatment.** Twelve month-old  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIg2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Axin2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition  $\pm$  standard deviation. There was no statistical difference between groups using Student's *t* test. (TIF)

**Figure S9 Expression of IGFBP2 and IGF1R in response to ACTH treatment.** Twelve month-old AdIg2,  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIg2 transgenic mice were untreated or treated for two months with ACTH. IGFBP2 and IGF1R expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t* test. (TIF)

## Acknowledgments

The authors would like to thank Christelle Damon (Anipath Clermont) for excellent management of the histo-pathology core facility. They would also like to thank Khirredine Ouchen, Sandrine Plantade and Christine Puchol for animal care.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PV AM AMLM BR. Performed the experiments: CD AB BR FT RB ISB CDJ MBL. Analyzed the data: CD AB BR FT JB AM PV. Contributed reagents/materials/analysis tools: CD AB BR FT RB ISB CDJ MBL. Wrote the paper: PV.

## References

- Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, et al. (2000) Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 88: 711–736.
- Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M (2011) Contemporary management of adrenocortical carcinoma. *Eur Urol* 60: 1055–1065.
- Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tisser F, et al. (2006) Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of



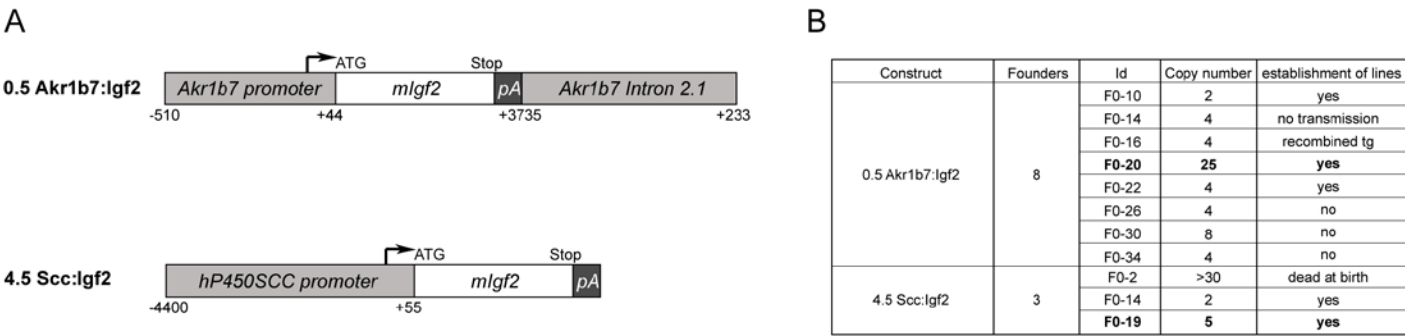
- cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91: 2650–2655.
4. Assie G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, et al. (2007) Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92: 148–154.
  5. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, et al. (2007) Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med* 356: 2372–2380.
  6. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Casa SD, et al. (2005) Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer* 12: 657–666.
  7. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, et al. (2001) Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg* 25: 891–897.
  8. Gicquel C, Raffin-Sanson M, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, et al. (1997) Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2559–2565.
  9. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misk DE, et al. (2003) Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* 162: 521–531.
  10. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, et al. (2005) Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1819–1829.
  11. Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, et al. (2011) beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res* 17: 328–336.
  12. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, et al. (2005) Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* 65: 7622–7627.
  13. Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P (2011) Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol* 351: 87–95.
  14. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Jossineau C, Damon-Soubeyrand C, et al. (2010) Constitutive  $\beta$ -catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* 19: 1561–1576.
  15. Rump P, Zeegers MPA, van Essen AJ (2005) Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am J Med Genet A* 136: 95–104.
  16. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, et al. (2001) Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* 61: 6762–6767.
  17. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D (1997) Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol* 136: 296–303.
  18. Boulle N, Logié A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y (1998) Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1713–1720.
  19. Barlasakar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, et al. (2009) Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 204–212.
  20. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, et al. (2008) Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3524–3531.
  21. Sun FL, Dean WL, Kelsey G, Allen ND, Reik W (1997) Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 389: 809–815.
  22. Eggenschwiler J, Ludwig T, Fisher P, Leighton PA, Tilghman SM, et al. (1997) Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Beckwith syndromes. *Genes Dev* 11: 3128–3142.
  23. Weber MM, Fottner C, Schmidt P, Brodowski KM, Gittner K, et al. (1999) Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. *Endocrinology* 140: 1537–1543.
  24. Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ (2002) Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 21: 8196–8205.
  25. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, et al. (1999) Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo J* 18: 5931–5942.
  26. Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Veyssiere G, et al. (2004) Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3010–3019.
  27. Val P, Jeays-Ward C, Swain A (2006) Identification of a novel population of adrenal-like cells in the mammalian testis. *Dev Biol* 299: 250–256.
  28. Lambert-Langlais S, Val P, Guyot S, Ragazzon B, Sahut-Barnola I, et al. (2009) A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 300: 197–204.
  29. Hu MC, Chou SJ, Huang YY, Hsu NC, Li H, et al. (1999) Tissue-specific, hormonal, and developmental regulation of SCC-LacZ expression in transgenic mice leads to adrenocortical zone characterization. *Endocrinology* 140: 5609–5618.
  30. Bielinska M, Kiiveri S, Parviainen H, Mannisto S, Heikinheimo M, et al. (2006) Gonadectomy-induced adrenocortical neoplasia in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*) and laboratory mouse. *Vet Pathol* 43: 97–117.
  31. Romero DG, Yanes LL, de Rodriguez AF, Plonczynski MW, Welsh BL, et al. (2007) Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology* 148: 2644–2652.
  32. King P, Paul A, Laufer E (2009) Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21185–21190.
  33. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785–789.
  34. Morali OG, Delmas V, Moore R, Jeanney C, Thierry JP, et al. (2001) IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20: 4942–4950.
  35. Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, et al. (2005) Erk associates with and primes GSK-3 $\beta$  for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* 19: 159–170.
  36. Verras M, Sun Z (2005) Beta-catenin is involved in insulin-like growth factor 1-mediated transactivation of the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 19: 391–398.
  37. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, et al. (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282: 11221–11229.
  38. Papotti M, Libé R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, et al. (2011) The Weiss Score and Beyond-histopathology for Adrenocortical Carcinoma. *Horm Canc* 2: 333–340.
  39. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, et al. (2009) Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* 27: 1108–1115.
  40. Moorehead RA, Sanchez OH, Baldwin RM, Khokha R (2003) Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma. *Oncogene* 22: 853–857.
  41. Moorehead RA, Fata JE, Johnson MB, Khokha R (2001) Inhibition of mammary epithelial apoptosis and sustained phosphorylation of Akt/PKB in MMTV-IGF-II transgenic mice. *Cell Death Differ* 8: 16–29.
  42. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P (2007) The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 28: 20–47.
  43. Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, de Boom Witzel S, et al. (2005) Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* 307: 1976–1978. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731405>. Accessed 27 March 2012.
  44. Harper J, Burns JL, Foulstone EJ, Pignatelli M, Zaina S, et al. (2006) Soluble IGF2 receptor rescues Apc(Min/+) intestinal adenoma progression induced by Igf2 loss of imprinting. *Cancer Res* 66: 1940–1948.
  45. Hassan AB, Howell JA (2000) Insulin-like growth factor II supply modifies growth of intestinal adenoma in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res* 60: 1070–1076.
  46. Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, et al. (2000) Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem* 275: 28341–28344.
  47. Corcoran RB, Bachar Raveh T, Barakat MT, Lee EY, Scott MP (2008) Insulin-like growth factor 2 is required for progression to advanced medulloblastoma in patched1 heterozygous mice. *Cancer Res* 68: 8788–8795.
  48. Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G (2004) Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* 23: 3138–3144.
  49. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, et al. (2010) Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res* 70: 4666–4675.
  50. McCauley RG, Beckwith JB, Elias ER, Faerber EN, Prewitt LH Jr, et al. (1991) Benign hemorrhagic adrenocortical macrocysts in Beckwith-Wiedemann syndrome. *AJR Am J Roentgenol* 157: 549–552.
  51. Taurin S, Sandbo N, Yau DM, Sethakorn N, Dulin NO (2008) Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C1169–C1174.
  52. Mattos GE, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Lotfi CFP (2011) Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. *Cell Tissue Res* 345: 343–356.
  53. Hoefflich A, Fettscher O, Lahm H, Blum WF, Kolb HJ, et al. (2000) Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res* 60: 834–838.
  54. Kim AC, Barlasakar FM, Heaton JH, Else T, Kelly VR, et al. (2009) In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev* 30: 241–263.



55. Laufer E, Kesper D, Vortkamp A, King P (2012) Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Mol Cell Endocrinol* 351: 19–27.
56. Fernandez C, Tatard VM, Bertrand N, Dahmane N (2010) Differential modulation of Sonic-hedgehog-induced cerebellar granule cell precursor proliferation by the IGF signaling network. *Dev Neurosci* 32: 59–70.
57. Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schüller U, et al. (2005) Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol* 166: 1153–1162.
58. Hardouin SN, Guo R, Romeo P-H, Nagy A, Aubin JE (2011) Impaired mesenchymal stem cell differentiation and osteoclastogenesis in mice deficient for Igf2-P2 transcripts. *Development* 138: 203–213.



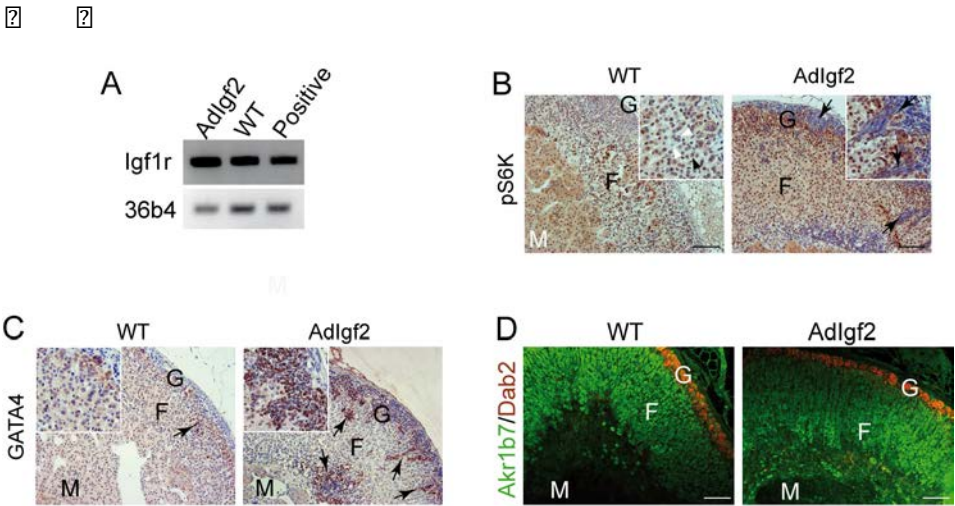




Supplementary Figure 1

**Figure S1. Establishment of transgenic lines overexpressing Igf2.**

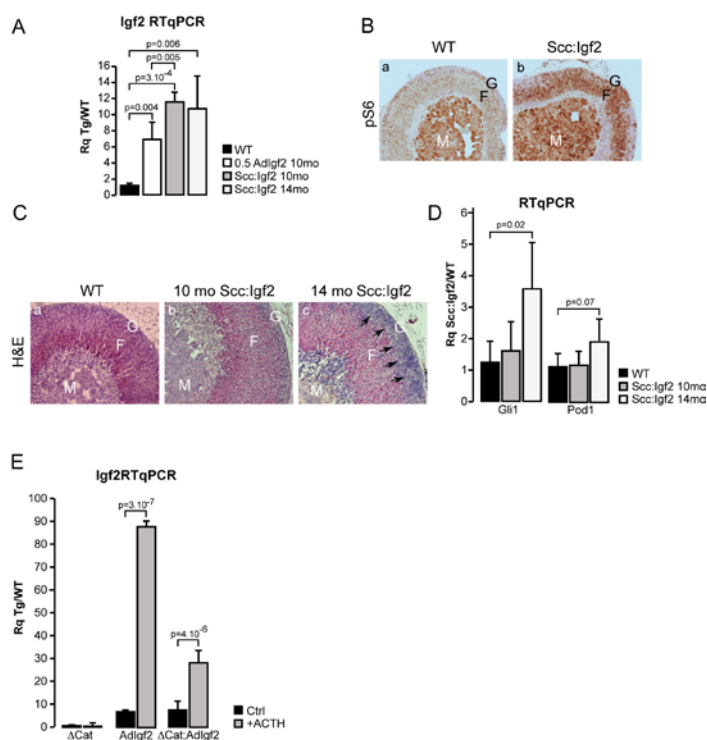
**A- Transgene constructs.** The 0.5 akr1b7:Igf2 transgene was constructed by cloning the full length mouse Igf2 cDNA (mIgf2) downstream of the Akr1b7 promoter (-510/+44) and upstream of a 3.5 kb segment of Akr1b7 intragenic regions, spanning intron 1 to intron 2 (Akr1b7 intron 2.1). The 4.5 Scc:Igf2 transgene was constructed by cloning mouse Igf2 cDNA downstream of a 4.5kb segment of human P450SCC regulatory regions (hP450SCC promoter) pA: mini intron and polyadenylation signal of SV40 T antigen. **B- Founders and lines.** Transgene constructs were microinjected into pronuclei of fertilized oocytes and transferred to pseudopregnant females. The table summarizes the outcome of these experiments by showing the number and identification (Id) of founders. Transgene copy numbers were evaluated by southern-blotting.



Supplementary Figure 2

**Figure S2. A- Igf1r is expressed in the adrenal.** Expression of Igf1 receptor (igf1r) was evaluated by RT-PCR with cDNAs from wild-type (WT) and transgenic adrenals (AdIgf2). The positive control was composed of a mix of cDNAs from adrenals, testes, ovaries, spleen and liver. RT-PCR for 36b4 was included as a normalization reference. **B- S6Kinase phosphorylation is increased in AdIgf2 adrenals.** Expression of the phosphorylated S6Kinase was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells that are negative for phospho-S6Kinase staining. White arrowheads show negative cells in the wild-type adrenals. **C- GATA4 expression is increased in AdIGF2 adrenals.** Expression of GATA4 was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show GATA4-positive infiltrating cells. **D- Relative positions of zona glomerulosa and zona fasciculata are maintained in AdIgf2 adrenals.** Expression of Akr1b7 (green, fasciculata) and Dab2 (red, glomerulosa) was detected by co-immunohistochemistry on sections from wild-type and AdIgf2 adrenals. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80 μm.

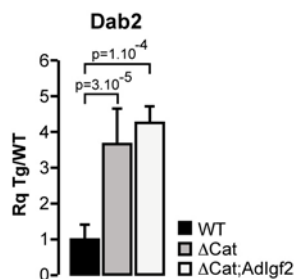




Supplementary Figure 3

### Figure S3. Characterisation of the adrenal phenotype in Scc:Igf2 transgenic mice.

**A- Expression levels of Igf2 in the two transgenic lines.** Igf2 expression was analysed by RTqPCR on cDNAs from 10 month-old wild-type, 0.5 AdIgf2 and Scc:Igf2 (10 and 14 month-old) adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq AdIgf2/WT) of Igf2 expression for each tissue in at least 5 samples per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **B- Igf2 signalling is increased in Scc:Igf2 adrenals.** Expression of the phosphorylated ribosomal protein S6 was analysed by immunohistochemistry in WT (a) and AdIgf2 (b) adrenals. **C- Effect of Igf2 overexpression on adrenal histology and differentiation.** Histology was analysed by haematoxylin & eosin staining in wild-type (a), 10 month-old (b) and 14 month-old Scc:Igf2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **D- Adrenal progenitor cells markers are overexpressed in Scc:Igf2 adrenal.** Expression of the progenitor cells markers, Gli1 and Pod1 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT) and Scc:Igf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Scc:Igf2/WT) of gene expression for each marker in at least 7 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **E- Expression of Igf2 after ACTH induction.** Twelve month-old  $\Delta$ Cat, AdIgf2 and  $\Delta$ Cat;AdIgf2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Igf2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 4 adrenals per genotype and per condition  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80  $\mu$ m.

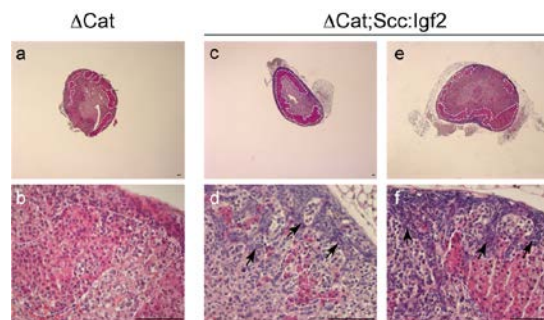


Supplementary Figure 4

### Figure S4. Expression of Dab2 in 10 month-old $\Delta$ Cat and $\Delta$ Cat;AdIgf2 adrenals.

Expression of the zona glomerulosa marker Dab2 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT),  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test.

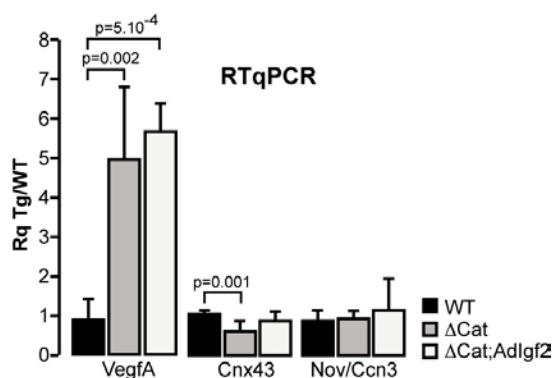




Supplementary Figure 5

#### Figure S5. Analysis of the adrenal phenotype in 10 month-old $\Delta$ Cat;Scc:Igf2 mice.

Scc:Igf2 transgenic mice were mated with  $\Delta$ Cat mice to generate  $\Delta$ Cat;Scc:Igf2 compound transgenics. The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 10 month-old animals. Two  $\Delta$ Cat;Scc:Igf2 individuals showing the mildest (c,d) and worst (e,f) phenotypes were included. Pictures in d and f and g represent high magnification details of the corresponding adrenals in c and e respectively. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. White dashed lines demarcate areas of compact cells accumulation. Accumulation of these cells in over 75% of the adrenal is considered as 1 point in Weiss score determination. Scale bar is 80 $\mu$ m.

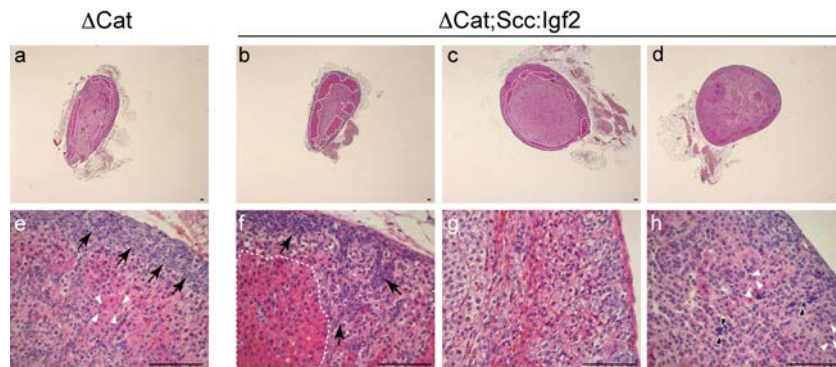


Supplementary Figure 6

#### Figure S6. Analysis of malignancy markers expression in 14 month-old $\Delta$ Cat;AdIgf2 adrenals.

Expression of VegfA, Connexin $\alpha$ 43 (cnx43) and Nov/Ccn3 was analysed by RTqPCR with cDNAs from 14 month-old wild-type (WT),  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 6 adrenals per genotype  $\pm$  standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test.

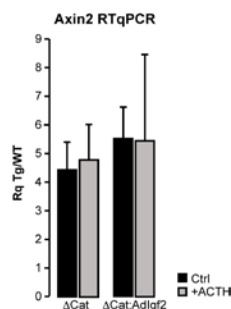




Supplementary Figure 7

**Figure S7. Analysis of the adrenal phenotype in 14 month-old  $\Delta$ Cat;Scclgf2 mice.**

The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 14 month-old animals. Three different  $\Delta$ Cat;Scclgf2 adrenals showing the range of phenotypes are presented (b-h). Pictures in f,g and h show high magnification details of pictures in b,c and d respectively. The adrenal in b and f is composed of a majority of compact cells (Weiss 1) delineated by white dashed lines. The adrenal in c and g is mostly composed of a central macro-nodule of spongiocytic cells, but only shows mild accumulation of compact cells (Weiss 0). The adrenal in d and h shows multiple areas of nuclear pleomorphism (white arrowheads, Weiss 1) and lymphocytic invasion (black arrowheads). Please note that the  $\Delta$ Cat adrenal in a and e also shows nuclear pleomorphism (Weiss 1), although overall cortical organisation is preserved. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. Scale bar is 80 $\mu$ m.



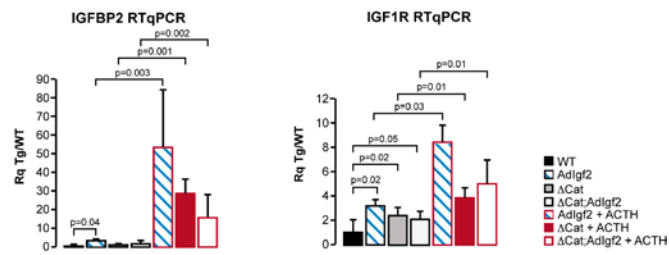
**Figure S8. Expression of Wnt target gene Axin2 in  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlglf2 adrenals after ACTH treatment.**

Twelve month-old  $\Delta$ Cat and  $\Delta$ Cat;Adlglf2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Axin2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition  $\pm$  standard deviation. There was no statistical difference between groups using Student's *t* test.

Supplementary Figure 8







**Figure S9. Expression of IGFBP2 and IGF1R in response to ACTH treatment.**

Twelve month-old Adlgf2, ΔCat and ΔCat:Adlgf2 transgenic mice were untreated or treated for two months with ACTH. IGFBP2 and IGF1R expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t* test.



## Conclusion et discussion

---

### A/ La surexpression de IGF2 ne joue pas de rôle majeur dans le développement du corticosurréalome

L'analyse du phénotype des souris AdIgf2 indique que la surexpression de Igf2 seule n'initie pas le développement tumoral cortico-surrénalien. De plus, la surexpression de Igf2 dans un contexte d'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine (souris  $\Delta$ Cat;AdIgf2) n'induit pas de progression tumorale à des stades précoces. Toutefois à un stade plus tardif, une aggravation des caractéristiques histologiques est observée chez les souris  $\Delta$ Cat;AdIgf2 avec un score de Weiss et un index Ki67 augmentés par rapport aux souris  $\Delta$ Cat. Malgré cela, le développement de CCS chez les double transgéniques reste un événement rare, même dans des conditions permettant une surexpression de Igf2 proche de celle retrouvée dans les CCS humains. Ces résultats sont confirmés par un autre modèle murin de surexpression de Igf2 et d'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine (Heaton et al., 2012). Afin de surexprimer Igf2, les auteurs ont utilisé un modèle de souris transgéniques présentant des sites LoxP de part et d'autre de l'ICR de H19 et exprimant la recombinaison Cre sous le contrôle des régions régulatrices de Sf1 (souris H19<sup>ΔMD</sup>). La perte de cet ICR induit une expression bi-allélique de Igf2 (Thorvaldsen et al., 2006). L'analyse des surrénales de ces souris ne met pas en évidence de développement tumoral (Heaton et al., 2012), confirmant que la surexpression de Igf2 seul ne permet pas la formation de tumeurs cortico-surrénaliennes. Afin d'étudier la possible coopération des voies Wnt/ $\beta$ -caténine et Igf2 dans la progression tumorale, les auteurs ont croisé leur modèle de surexpression de Igf2 avec des souris invalidées pour *APC*, spécifiquement dans le cortex surrénalien (APC KO). Les souris APC KO, comme les souris  $\Delta$ Cat, présentent une hyperplasie bénigne mais ne développent pas de CCS (Heaton et al., 2012). L'analyse du modèle murin APC KO-H19<sup>ΔMD</sup>, présentant les deux altérations, confirme que le développement de CCS chez ces souris est un événement peu fréquent (Heaton et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats démontre que dans les modèles murins, la surexpression de Igf2 n'est pas un acteur majeur de la progression tumorale cortico-surrénalienne, même associée à l'activation de la  $\beta$ -caténine. De récentes observations réalisées chez les patients sont en accord avec ces données. En effet, les CCS avec surexpression de IGF2 ne peuvent



être distingués des CCS sans surexpression de ce facteur de croissance (Guillaud-Bataille et al., 2014), que ce soit sur la base du score de Weiss, de l'index Ki67 et de la classification ENSAT. Ces données sont renforcées par une survie globale et sans récurrence équivalentes entre les deux groupes (Guillaud-Bataille et al., 2014). La surexpression de IGF2 dans les CCS ne semble donc pas être un facteur majeur de progression tumorale.

De ce fait les thérapies visant à inhiber la signalisation IGF ne devraient présenter que peu d'efficacité. En effet, lors d'essais cliniques d'inhibition des récepteurs IGF-IR et IR (OSI-906) ou uniquement d'inhibition de IGF-IR (Figitumumab), seule une réponse partielle a pu être observée sur 25 patients (Carden et al., 2010; Haluska et al., 2010). De la même façon, l'inhibition du récepteur IGF-IR par un anticorps monoclonal (IMC-A12) en association avec du mitotane comme première ligne de traitement pour des CCS avancés-métastatiques n'a apporté qu'une réponse partielle pour 20 patients inclus (Lerario et al., 2014b).

En conclusion, malgré une forte surexpression dans la quasi totalité des corticosurrénalomes, IGF2 ne semble pas jouer un rôle majeur dans la progression tumorale et ne constitue donc pas une cible thérapeutique pertinente.

L'absence de développement tumoral lors de la surexpression de IGF2 pourrait en partie être expliquée par l'absence d'activation de la voie  $\beta$ -caténine en réponse à IGF2 dans la cortico-surrénale. Dans différents modèles cellulaires, la  $\beta$ -caténine peut être stabilisée par la voie PI3K/AKT ou par la voie MAP Kinase, soit directement par phosphorylation de sa sérine 552, soit indirectement par phosphorylation de GSK3 $\beta$  sur sa sérine 9, induisant son inhibition (Cross et al., 1995; Ding et al., 2005; Fang et al., 2007). La liaison de IGF2 à son récepteur IGF-IR peut permettre d'activer ces voies et donc expliquer l'activation de la  $\beta$ -caténine en réponse à la signalisation IGF (Moralì et al., 2001; Verras and Sun, 2005). Dans les surrénales des animaux surexprimant Igf2 (AdIgf2 ou Sccl:Igf2), nous n'avons pas mis en évidence d'activation de la voie  $\beta$ -caténine. De la même façon, chez les patients, alors que IGF2 est surexprimé dans 90% des CCS, seulement 39,2% affichent une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Gaujoux et al., 2011; Gicquel et al., 1997b; Giordano et al., 2003), suggérant que le croisement des voies IGF et  $\beta$ -caténine n'a pas lieu dans la cortico-surrénale. Ainsi, l'activation de la  $\beta$ -caténine par la signalisation IGF pourrait être requise pour médier les effets oncogéniques de IGF2. Des mécanismes tissus-spécifiques empêchant le croisement de ces deux voies dans la cortico-surrénale préviendraient donc la mobilisation des effets pro-tumoraux de la signalisation IGF dans ce tissu.



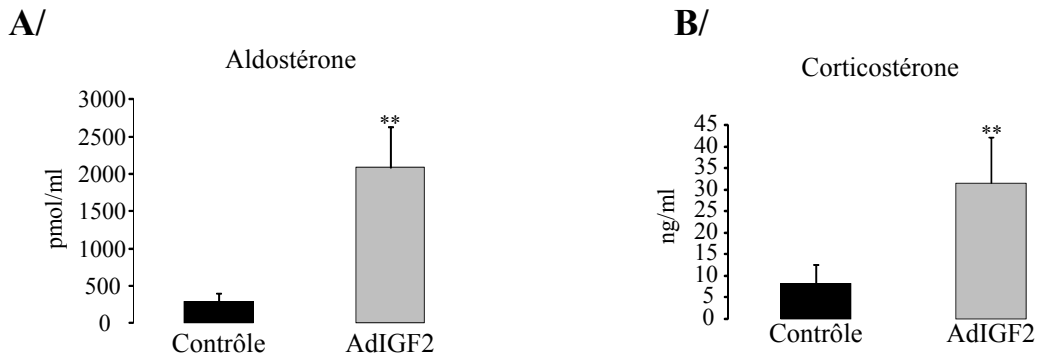
Les altérations au locus 11p15.5 sont très fréquentes dans les CCS. IGF2 ne semblant pas être un acteur majeur de la progression tumorale cortico-surrénalienne, d'autres gènes présents à ce locus et co-dérégulés avec IGF2 pourraient être impliqués dans ce phénomène. Ce locus contient également l'inhibiteur du cycle cellulaire  $p57^{Kip2}$ , dont l'expression est diminuée dans les CCS (Bourcigaux et al., 2000). L'invalidation de  $p57^{Kip2}$  dans un modèle murin provoque une létalité périnatale rendant difficile des études sur le développement tumoral (Zhang et al., 1997). Toutefois, l'analyse du phénotype surrénalien à la naissance met en évidence une hyperplasie des surrénales (Zhang et al., 1997).  $p57^{Kip2}$  pourrait donc être impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans le cortex surrénalien et donc jouer un rôle dans le développement de tumeurs cortico-surrénaliennes.

Parmi les candidats présents au locus, on trouve également le micro-RNA miR-483, localisé dans l'intron 2 du gène *IGF2*, qui est surexprimé dans les CCS et associé à un mauvais pronostic (Patterson et al., 2011; Soon et al., 2009b). miR-483 favorise l'invasion et la migration de cellules de cancer du poumon *in vitro* et en xénogreffe (Song et al., 2014). Il pourrait donc jouer un rôle dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. D'autre part, l'hypométhylation du gène *LIT1* (ou *KCNQ1OT1*) a été associé à des tumeurs cortico-surrénaliennes pédiatriques (Wijnen et al., 2012). *LIT1* code un ARN non traduit impliqué dans la régulation négative de l'expression de  $p57^{Kip2}$  et de *KCNQ1* (Fitzpatrick et al., 2002; Mancini-DiNardo et al., 2003). L'hypométhylation de *LIT1* induit une diminution de l'expression de  $p57^{Kip2}$  (Diaz-Meyer et al., 2003). L'implication de *LIT1* dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne pourrait donc passer par ce contrôle de l'expression de  $p57^{Kip2}$ .

A ce locus, on retrouve également, *HOTS* (H19 opposite tumor suppressor), un transcrit anti-sens de *H19*, ayant comme *H19*, une expression maternelle (Onyango and Feinberg, 2011). La perte de l'empreinte au locus *H19* ou une perte d'hétérozygotie induit la perte d'expression de *HOTS* (Onyango and Feinberg, 2011). L'inhibition de *HOTS* par shARN dans des cellules HeLa induit une augmentation de prolifération en culture cellulaire et en xénogreffe, suggérant une action suppresseur de tumeur (Onyango and Feinberg, 2011). Ainsi, les réarrangement du locus 11p15.5 observés dans les CCS, peuvent induire la perte d'expression de potentiels suppresseurs de tumeurs ( $p57^{Kip2}$  et *HOTS*) ou l'augmentation de facteurs potentiels impliqués dans la tumorigenèse (miR-483 et *LIT1*).

Nos modèles murins reposant sur la surexpression de *Igf2* par l'insertion aléatoire d'un transgène porteur de son ADNc ne permettent pas l'analyse de l'implication de ces différents



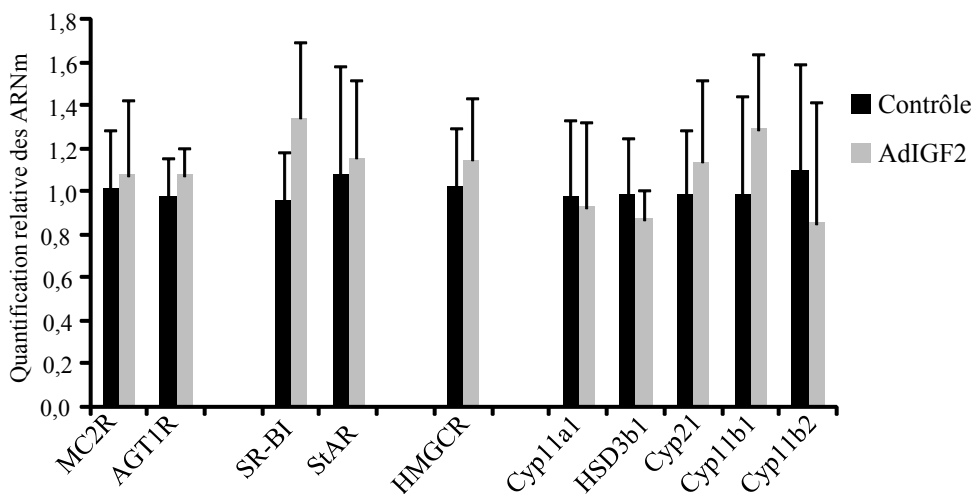


**Figure 37 : Hypersécrétion d'aldostérone et de corticostérone chez les souris AdIgf2.**

**A/** Dosage de la concentration plasmatique d'aldostérone par test ELISA sur 5 animaux de chaque génotype. Le graphique représente la valeur moyenne.

**B/** Dosage de la concentration plasmatique de corticostérone par RIA sur 5 animaux de chaque génotype. Le graphique représente la valeur moyenne.

Test t de Student, \*  $p \leq 0.05$  ; \*\*  $p \leq 0.01$  ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



**Figure 38 : Analyse par RTqPCR de l'expression des acteurs intervenant dans la stéroïdogénèse.**

Accumulation relative des transcrits des acteurs de la stéroïdogénèse. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à l'expression du gène de ménage *Ppib* ou *36b4*. Le graphique représente la moyenne des niveaux relatifs d'expression de 4 souris AdIgf2 par rapport à 7 souris sauvages.

facteurs dans le processus oncogénique. Dans le modèle murin  $H19^{\Delta DMD}$ , utilisé par l'équipe du Dr Hammer pour induire une augmentation de l'expression de *Igf2* dans la cortico-surrénale, l'allèle floxé pour l'ICR est transmis maternellement (Heaton et al., 2012), induisant une diminution d'expression de *H19* (Thorvaldsen et al., 1998). Ceci laisse supposer que l'expression de *HOTS* devrait également être réduite dans ce modèle. L'absence de développement tumoral chez les souris  $H19^{\Delta DMD}$  pourrait suggérer que *HOTS* n'est pas impliqué dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Le niveau d'expression de *HOTS* n'ayant pas été analysé, il est toutefois possible que ce gène soit régulé différemment de *H19* après la perte de l'ICR. Une analyse de l'expression de *HOTS* dans les surrénales des animaux  $H19^{\Delta DMD}$  serait donc nécessaire pour l'impliquer ou non dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne.

## **B/ Rôle de IGF2 dans l'hyperactivité endocrine ?**

Même si *Igf2* ne joue pas un rôle majeur dans la tumorigenèse, nous avons pu montrer que la surexpression de *Igf2* chez les souris *AdIgf2* induit une augmentation de la production d'aldostérone (x7, Figure 37A) et de corticostérone (x4, Figure 37B). Cette hyperactivité endocrine pourrait être le résultat de la stimulation de l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, suite à l'activation de la voie IGF2. L'analyse de l'accumulation des ARNm des acteurs intervenant dans la stéroïdogénèse ne révèle aucune variation significative (Figure 38). Ces données ne nous permettent pas d'exclure des mécanismes modulant la traduction et/ou la stabilité des enzymes de la stéroïdogénèse surrénalienne. Une des étapes limitantes de la stéroïdogénèse est l'entrée de cholestérol dans la mitochondrie, permise par la protéine *StAR* (Stocco, 2001). L'expression de l'ARNm de *StAR* n'est pas augmentée dans les surrénales des souris *AdIGF2* (Figure 38). Toutefois, son activité est stimulée par phosphorylation de sa serine 232 par les kinases ERK 1/2 (Poderoso et al., 2008). La signalisation IGF2, activant la kinase ERK, pourrait induire la phosphorylation de *StAR* et donc permettre la stimulation de son activité dans les surrénales des souris *AdIgf2*. L'anticorps disponible pour la forme phosphorylée de *StAR* ne fonctionnant pas, nous n'avons malheureusement pas pu étudier cette hypothèse.

La pertinence de cette hyperactivité endocrine chez les souris *AdIgf2* est toutefois remise en cause par la comparaison des CCS humains surexprimant ou non IGF2. En effet, les CCS ne présentant pas de surexpression de IGF2 sont majoritairement sécrétants, comme les



CCS surexprimant ce facteur de croissance (Guillaud-Bataille et al., 2014). De plus, nous avons observé une co-sécrétion d'aldostérone et de corticostérone qui n'est que rarement observée chez les patients. Ces observations pourraient donc être le reflet de mécanismes de régulation de la stéroïdogénèse, spécifiques d'espèce.



## Identification de EZH2 comme un nouvel acteur de la progression tumorale dans les CCS

---

### Introduction

Les CCS sont des tumeurs malignes agressives pour lesquelles actuellement aucune thérapie efficace n'est disponible (Kirschner, 2012). Il est donc nécessaire d'identifier les acteurs impliqués dans le développement de ces tumeurs, afin de pouvoir développer de nouvelles approches. Les deux altérations les plus fréquentes chez les patients sont la surexpression du facteur de croissance IGF2 et l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine (Gaujoux et al., 2011; Giordano et al., 2003). Notre équipe a pu montrer à l'aide du modèle murin  $\Delta$ Cat, présentant une activation de la  $\beta$ -caténine spécifiquement dans le cortex surrénalien, que la  $\beta$ -caténine est un oncogène surrénalien (Berthon et al., 2010). Toutefois, même si la  $\beta$ -caténine initie le développement tumoral, la faible pénétrance des CCS chez ces animaux suggère la nécessité d'altérations supplémentaires pour permettre la transition bénin-malin (Berthon et al., 2010). La surexpression de Igf2 dans un modèle murin (AdIgf2), n'initie pas le développement tumoral dans le cortex (Drelon et al., 2012). La surexpression de IGF2 et l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine étant les deux altérations les plus fréquentes dans les CCS humains (Gaujoux et al., 2011; Giordano et al., 2003), nous avons évalué la coopération de ces deux voies dans la progression maligne à l'aide des souris  $\Delta$ Cat;AdIgf2. La combinaison de ces deux altérations n'a qu'un effet modéré sur le développement de CCS (Drelon et al., 2012, 2013). Ces données sont confirmées dans un autre modèle murin présentant également l'association de ces deux altérations dans la cortico-surrénale (Heaton et al., 2012). Dans ce modèle, où la surexpression de Igf2 est permise par la délétion de l'ICR de *h19* et l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est déclenchée par la perte de *Apc*, le développement de CCS est un événement rare (1/14) (Heaton et al., 2012). Enfin, les différents essais cliniques utilisant des inhibiteurs du récepteur IGF-IR, ne mettent en évidence que de rares réponses partielles (Carden et al., 2010; Haluska et al., 2010; Lerario et al., 2014b). D'autres altérations participent donc à la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Celles-ci doivent être identifiées afin de développer des thérapies ciblées plus efficaces.

Les facteurs à l'origine du maintien du statut épigénétique des cellules telles que les histones méthyltransferases (HMTases) sont fréquemment altérés et impliqués dans le



développement tumoral (Albert and Helin, 2010). Parmi celles-ci, on retrouve l'HMTase EZH2 (Chang and Hung) qui appartient au complexe PRC2 (Polycomb Repressor Complex 2) et permet la mise en place de la marque répressive H3K27me3 (triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 27) (Cao and Zhang, 2004). EZH2 est associé, au sein du complexe PRC2, aux protéines SUZ12, EED (Embryonic Ectoderm Development) et RbAp48 (Retinoblastoma (Rb)-associated protein 48 ou RBBP7/4) (Margueron and Reinberg, 2011). La marque H3K27me3, mise en place par EZH2, permet le recrutement du complexe PRC1 (Polycomb Repressor Complex 1) qui met en place la monoubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1) pour inhiber l'élongation transcriptionnelle dépendante de l'ARN polymérase II (Sauvageau and Sauvageau, 2010). PRC2 pourrait également recruter des DNMT (DNA MethylTransferase) ainsi que des HDAC (Histone DeAcetylase) afin d'assurer la compaction de la chromatine et la répression transcriptionnelle (Chase and Cross, 2011). Les gènes cibles de ce mécanisme de répression transcriptionnelle sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, tels que la régulation du cycle cellulaire, la différenciation et la sénescence (Sauvageau and Sauvageau, 2010).

La surexpression de EZH2, observée dans divers cancers, est fréquemment associée à des stades avancés et à un mauvais pronostic, notamment pour le cancer de la prostate (Varambally et al., 2002), du sein (Kleer et al., 2003), du rein (Wang et al., 2012) ou encore de l'ovaire (Rao et al., 2010). L'augmentation d'expression de EZH2 dans différentes lignées cellulaires favorise la prolifération cellulaire et les caractéristiques tumorales (invasion, migration) (Kleer et al., 2003; Lin et al., 2013). A l'inverse, la diminution d'expression de EZH2 par ARN interférence ou par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le DZNep (3-deazaneplanocin A) inhibe la prolifération et l'agressivité des cellules en culture et en xénogreffes (Avan et al., 2012; Girard et al., 2014; Karanikolas et al., 2010; Moore et al., 2013; Seward et al., 2013). Dans des modèles murins, la surexpression ciblée de *Ezh2* induit le développement d'une hyperplasie de l'épithélium mammaire et un syndrome myéloprolifératif, lorsque l'expression est ciblée dans les cellules souches hématopoïétiques (Herrera-Merchan et al., 2012; Li et al., 2009).

L'ensemble de ces données suggère que l'augmentation d'expression de EZH2 est impliquée dans le développement et la progression tumorale dans divers tissus. Nous avons donc cherché à déterminer si l'expression de EZH2 était altérée dans les CCS et si EZH2 pouvait jouer un rôle dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne.





## **Matériel et méthodes**

### Culture cellulaire

Les cellules de CCS humains H295R ont été cultivées dans du milieu DMEM/Ham's F12 supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (S1800-500, Biowest), 2mM de L-Glutamine (25030, Gibco), 50U/mL de pénicilline, 50mg/ml de streptomycine et 1X d'insuline transferrine sélénium (41400-045, Gibco).

### Transfection et traitement

Pour l'inhibition de EZH2 ou des facteurs de transcription E2F1 et E2F8 par siARN, les cellules H295R ont étéensemencées à 400 000 cellules par puits en plaque 6 puits. Les cellules ont ensuite été transfectées deux fois, à 24h d'intervalle. La transfection a été réalisée avec de l'Effectene (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les siARN utilisés sont : siGFP ACUACCAGCAGAACACCCCUU ; siEZH2 CAGAGAAUGUGGAUUUAUA ; siE2F1 (sc-29297, Santa Cruz) ; siE2F8 (sc-96849, Santa Cruz).

Pour l'inhibition pharmacologique de EZH2, les cellules H295R ont étéensemencées à 400 000 cellules par puits en plaque 6 puits. Après 24 heures, les cellules ont été traitées avec 0,5 ; 1,0 ou 5,0 $\mu$ M de DZNep (102052-95-9, Cayman Chemical). Le DZNep étant repris dans le DMSO, les conditions contrôles ont été réalisées avec des cellules traitées au DMSO. Les traitements se sont déroulés sur 2 ou 5 jours avec un changement de milieu toutes les 24 heures.

### Extraction protéique et western blot

Les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon NLB (Nuclei Lysis Buffer, 50mM Tris-HCl pH8.1, 10mM EDTA et 1% SDS) auquel ont été ajoutés des inhibiteurs de protéases (Complete, 11 697 498 001, Roche). Trente microgrammes de protéines totales ont été séparées sur gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été incubées avec les dilutions d'anticorps EZH2 (1/1000, 3147, Cell signaling), H3K27me3 (1/1000, 07-449, Millipore). L'accumulation de EZH2 a été rapportée à l'accumulation de l'actine (anticorps à 1/5000, A2066, Sigma). H3K27me3 a été rapportée à l'accumulation de l'histone H3 (1/1000, C-16, Santa Cruz).

Nom du gène	Séquences (5'-3')	Température
<i>ACTINE</i>	S : CGCGAGAAGATGACCCAGATC AS : TCACCGGAGTCCATCACGA	60°C
<i>EZH2</i>	S : TCCGGGATGCCGCTGCAA AS : AAATCCCCCAGCCTGCCA CG	60°C
<i>CYCLINE E</i>	S : TGAGTGGTGCGACATAGAGAA AS : TGTCCAGCAAATCCAAGCTG	60°C
<i>CYCLINE D2</i>	S : CATTGCTCTGTGTGCCACCG AS : GCGAGCTCACTTCCTCATCC	60°C
<i>CYCLINE A2</i>	S : CCCTCTTGATTATCCAATGG AS : CTTCATTAACACTCACTGGC	60°C
<i>CYCLINE B2</i>	S : CATGTGCGTTGGCATTATGG AS : CAAGAGCAGAGCAGTAATCC	60°C

**Figure 39 : Séquences des amorces de PCR quantitative et température d'utilisation.**

### Mesure de du taux de prolifération et analyse du cycle cellulaire

Le taux de prolifération des cellules H295R a été déterminé par comptage des cellules. Pour les expériences d'interférence ARN, les cellules ont été comptées 5 jours après la première transfection. Pour les expériences de traitement au DZNep, les cellules ont été comptées après 5 jours de traitement. Ce nombre de cellules a été rapporté au nombre de cellules ensemencées au départ et exprimé par rapport à la condition contrôle.

Pour les analyses du cycle cellulaire, les cellules ont été récupérées après 5 jours de transfection ou 5 jours de traitement. Les culots de cellules ont été resuspendus dans de la RNase A à 1mg/ml et du iodure de propidium à 25mg/ml. La répartition dans le cycle a été analysée par cytométrie en flux en mesurant l'incorporation de iodure de propidium.

### Mesure de l'accumulation des transcrits par RTqPCR

Les ARN totaux ont été extraits au Trizol (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. La reverse transcription de 1µg d'ARN a été réalisée à 42°C pendant 1 heure par amorçage aléatoire avec 5pmol d'amorces hexanucléotides (U1240 ; Promega), grâce à 200 unités de reverse transcriptase (M1701 ; Promega) et en présence de 2,5mM de dNTPs et de 20 unités d'inhibiteurs de RNase (recombinant RNAsin, N2615 ; Promega), dans un volume final de 12.5µl.

Les PCR quantitatives ont été réalisées à partir de 2µl d'ADNc dilué au 1/10. Le mélange réactionnel se compose de 2µl d'ADNc dilué, 5µl de SYBR Premix ExTaqII 2X (Takara), 10pmol de chaque amorce (Figure 39) dans un volume final de 10µl. Les niveaux relatifs d'expression ont été déterminés à partir de la méthode du  $\Delta\Delta C_t$  en normalisant l'expression grâce au gène de ménage *Actine*.

### Marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl dUTP nicken labeling)

Les cellules H295R ont été ensemencées sur des lamelles de verre à 400 000 cellules par puits de plaques 6 puits. Après deux jours de traitement, les cellules ont été fixées avec de la PFA à 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du Triton 0.1%. Les cellules ont été incubées dans un mélange contenant l'enzyme TdT à 20U/µl (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, EP0162, Thermo Scientific), de la Biotin-11-dUTP à 1mM (R0081, Thermo Scientific), de l'ATP à 1mM et le tampon de l'enzyme pendant 1 heure à 37°C. Puis les cellules ont été incubées avec de la



streptavidine-HRP (1/1000), 1 heure à température ambiante. L'activité HRP a été révélée par le kit TSA. Un marquage au Hoescht a été réalisé pour mettre en évidence les noyaux. Le taux de prolifération a été évalué par comptage des cellules TUNEL-positives sur cinq champs à fort grossissement (40x) pour chaque lamelle. Ce nombre de cellules apoptotiques a ensuite été rapporté au nombre total de cellules sur chaque champ, afin d'exprimer le nombre de cellules apoptotiques en pourcentage du nombre total de cellules. Pour chaque condition, trois lamelles ont été comptées et la moyenne de ces trois comptages a été réalisée.

#### Formation de colonie en soft agar

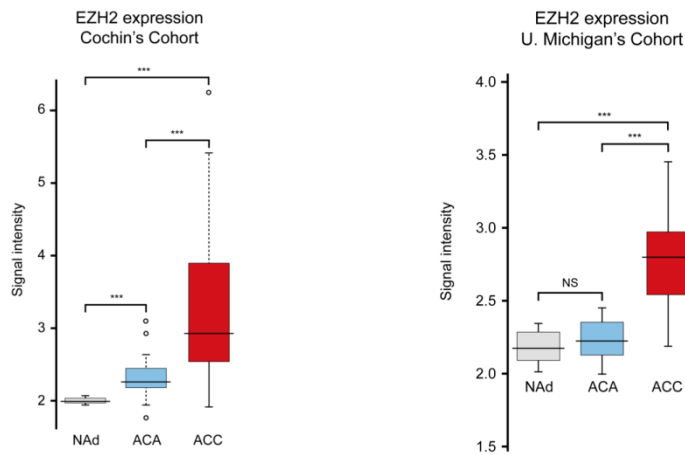
Une base agar à 0.75% a été préparée et 1ml de cette base a été déposé dans des puits de plaques 6 puits. Cet agar 0.75% a été obtenu par le mélange d'un volume équivalent d'agar 1.5% et de milieu DMEM-F12 2X. Ces plaques ont ensuite été stockées à 4°C pendant 24h.

Les cellules H295R ont étéensemencées à 400 000 cellules par puits en plaque 6 puits. Après 24 heures, les cellules ont été traitées pendant 2 jours avec du DZNep à 5µM ou du DMSO. Les cellules traitées ont ensuite été récupérées et comptées. Dix mille cellules ont été resuspendues dans de l'agar à 0.45%, obtenu par le mélange d'un volume équivalent d'agar 0.9% et de milieu DMEM-F12 2X. A ce mélange a été ajouté du DZNep à 5µM ou du DMSO en quantité équivalente. Les cellules dans l'agar 0.45% ont étéensemencées sur la base agar. Après 15 jours de croissance, les colonies ont été fixées à la PFA 4% et colorées au cristal violet.

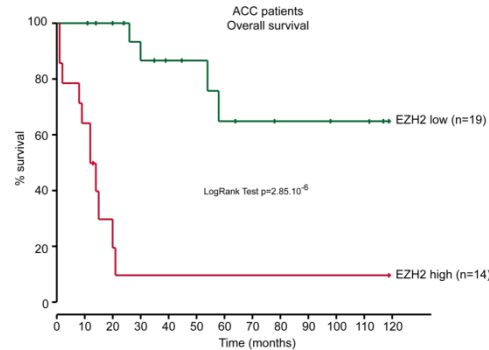
#### Test de blessure

Les cellules ont étéensemencées à  $3,5 \cdot 10^6$  cellules par puits en plaque 6 puits. Après 48 heures, une blessure a été réalisée à l'aide d'un cône de pipette 10µl. Les cellules ont alors été traitées avec du DZNep 5µM ou du DMSO pour le contrôle, pendant 5 jours. Après ce traitement, le comblement de la blessure a été mesuré à l'aide du logiciel Image J.

A/



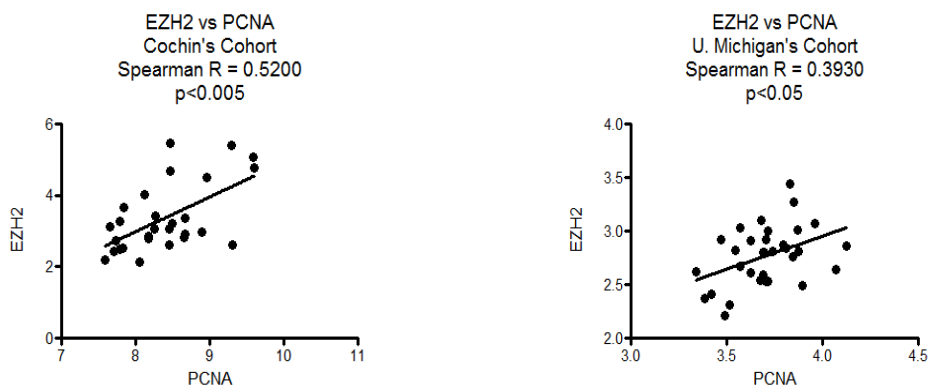
B/



**Figure 40 : *EZH2* est surexprimé et associé à un mauvais pronostic**

A/ Analyse de l'expression de *EZH2* dans deux cohortes indépendantes de patients (Giordano et al., 2008; de Reynies et al., 2009). Expression de *EZH2* dans des surrénales normales (NAd), des adénomes (ACA) et des carcinomes cortico-surrénaux (ACC).

B/ Analyse de la survie des patients porteurs d'un carcinome (ACC), en fonction du niveau d'expression de *EZH2* (Cohorte Cochlin, de Reynies et al., 2009).



**Figure 41 : L'expression de *EZH2* est associée à l'expression du marqueur de prolifération *PCNA*.**

La corrélation a été établie sur la base des données d'expression de *EZH2* et *PCNA* issues des transcriptomes des CCS des deux cohortes (Giordano et al., 2008; de Reynies et al., 2009).

## **Résultats**

### EZH2 est surexprimé dans les CCS et associé à un mauvais pronostic.

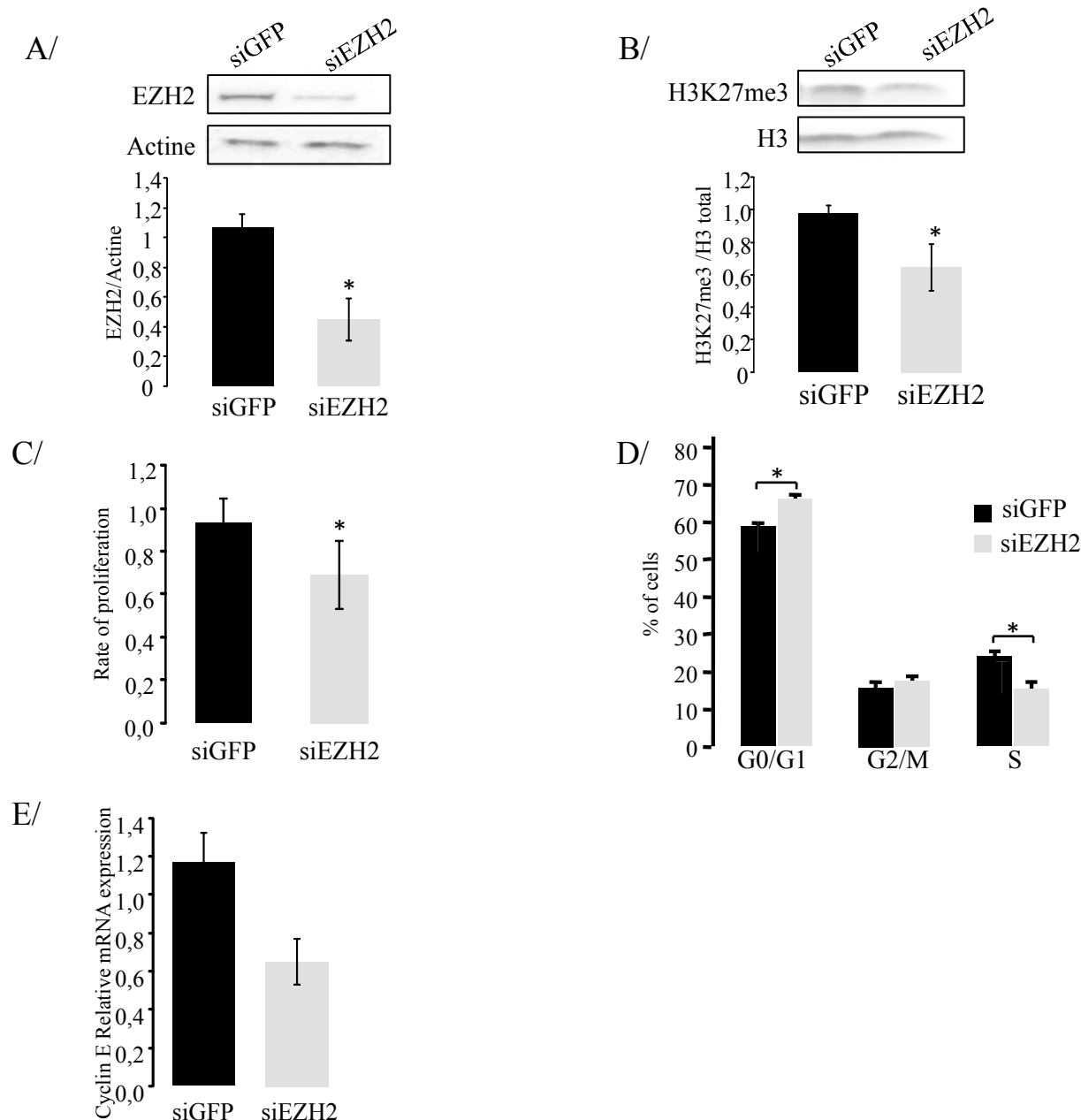
L'expression de EZH2 étant dérégulée dans de nombreux cancers, cette HMTase pourrait être un acteur important de la progression tumorale. Afin de déterminer si cela pouvait être le cas dans les tumeurs cortico-surréaliennes, une analyse rétrospective des données du transcriptome de deux cohortes indépendantes a été réalisée (Giordano et al., 2003; de Reynies et al., 2009). Celle-ci met en évidence une augmentation de l'expression de EZH2 dans les CCS par rapport aux ACS et aux tissus sains (Figure 40A). Dans le groupe des CCS, les patients ayant une forte surexpression de EZH2 présentent une survie globale plus courte que les patients ayant des niveaux plus faibles de EZH2 (Figure 40B). EZH2 est donc surexprimé dans les CCS et son expression est associée à un mauvais pronostic. EZH2 pourrait donc être un acteur de la progression tumorale cortico-surrénalienne.

EZH2 étant capable de favoriser la prolifération cellulaire dans divers cancers, nous avons tout d'abord évalué l'existence d'un lien entre prolifération et expression de EZH2 dans les CCS. Pour cela, à partir des données du transcriptome des patients (Giordano et al., 2003; de Reynies et al., 2009), une analyse de corrélation entre l'expression de EZH2 et du marqueur de prolifération PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) a été réalisée. Celle-ci révèle une forte association entre les niveaux d'expression de EZH2 et de PCNA dans les CCS (Figure 41), suggérant un rôle de EZH2 dans le contrôle de la prolifération des cellules cortico-surréaliennes.

### L'inhibition de EZH2 dans les cellules H295R par siARN induit une diminution de prolifération avec un arrêt du cycle en phase G0/G1.

Afin de comprendre le rôle de EZH2 dans les CCS, son expression a été inhibée par siARN dans les cellules de CCS humain H295R. L'accumulation de la protéine EZH2 est réduite de 60% suite à la transfection du siEZH2 dans les cellules H295R et ceci s'accompagne d'une réduction significative de 40% de la marque H3K27me3 (Figure 42A et B). L'expression de EZH2 étant associée à un marqueur de prolifération chez les patients, nous avons en premier lieu analysé l'impact de la perte de EZH2 sur la prolifération les cellules H295R. Le taux de prolifération des cellules transfectées avec le siARN dirigé contre EZH2 est significativement réduit par rapport aux cellules contrôles (siGFP) (Figure 42C).





**Figure 42 : L'inhibition de EZH2 dans les cellules H295R par siARN induit une diminution de prolifération avec un arrêt du cycle en phase G0/G1**

**A/** Analyse de l'accumulation de la protéine EZH2. La protéine EZH2 a été détectée par Western blot sur des extraits protéiques de cellules H295R transfectées avec un siARN contrôle (siGFP) ou dirigé contre EZH2 (siEZH2). Les niveaux d'accumulation de la protéine EZH2 ont été normalisés par l'actine. L'histogramme représente la quantification de trois expériences indépendantes.

**B/** Analyse de la marque H3K27me3. H3K27me3 a été détectée par Western blot à partir des protéines extraites des cellules H295R transfectées avec un siGFP ou un siEZH2. Les niveaux de d'accumulation de la marque H3K27me3 ont été normalisés par rapport à l'accumulation de la protéine H3. L'histogramme représente la quantification de trois expériences indépendantes.

**C/** Niveau de prolifération des cellules H295R. Les cellules ont été comptées cinq jours après transfection des siGFP ou siEZH2. Le graphique représente le taux de prolifération par rapport au nombre de cellules ensemencées au départ et exprimé par rapport à la condition contrôle (siGFP). Ces expériences ont été réalisées trois fois.

**D/** Analyse du cycle cellulaire des cellules H295R après transfusions de siARN contrôle (siGFP) ou dirigés contre EZH2. Le graphique représente le pourcentage de cellules en phase G0/G1, G2/M et S après cinq jours de transfection.

**E/** Quantification relative des transcrits du gène *Cycline E* après transfection des siARN GFP ou dirigé contre EZH2. La normalisation a été effectuée par rapport à l'accumulation des transcrits *Actine*.

Test t de Student, \*  $p \leq 0.05$ .

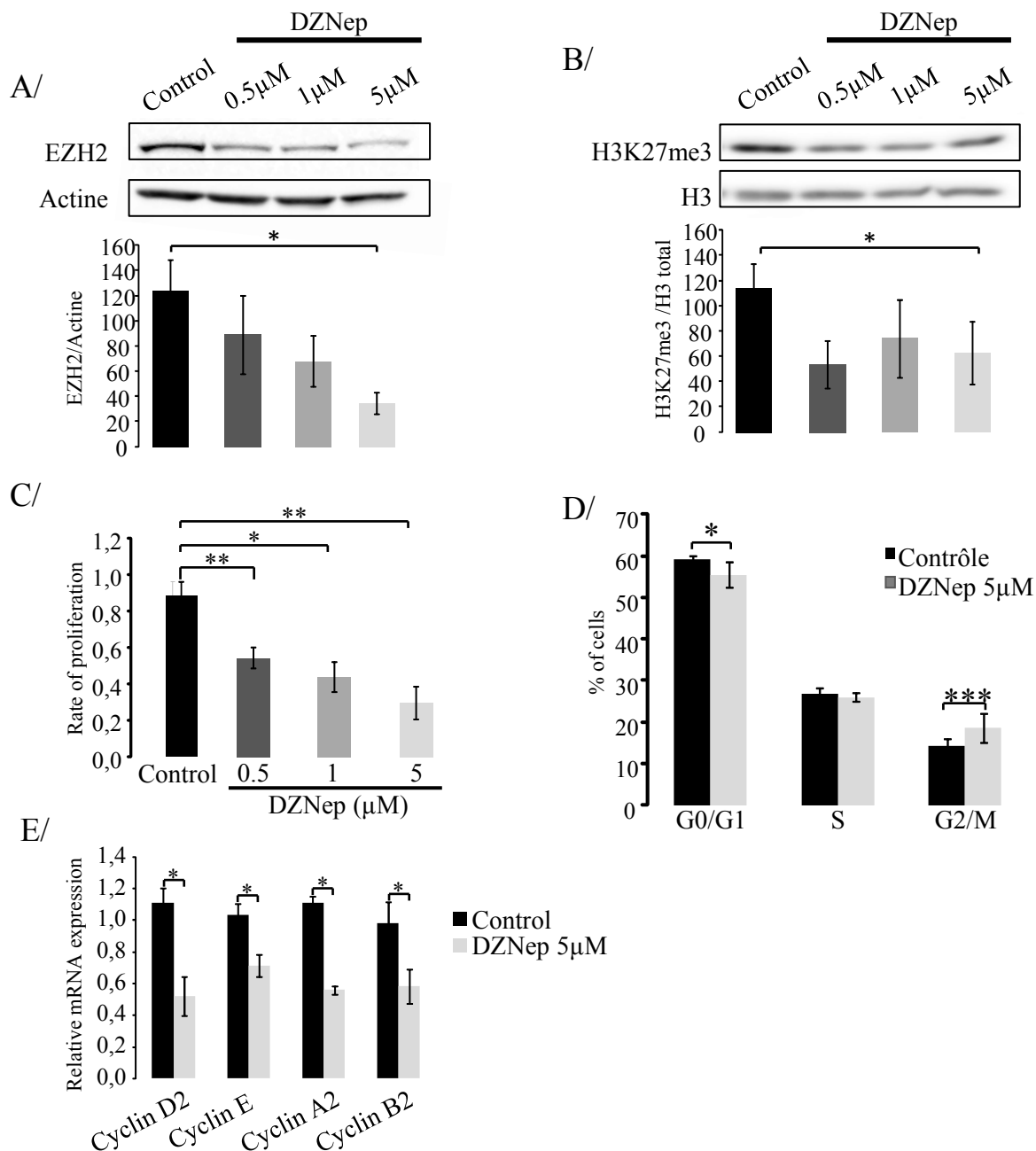
L'analyse du cycle cellulaire met en évidence une augmentation du nombre de cellules en phase G0/G1 avec une diminution du nombre de cellules en phase S lorsque l'expression de EZH2 est réduite (Figure 42D). En accord avec cet arrêt du cycle en phase G0/G1, nous observons une diminution des transcrits *Cycline E* dans les cellules où EZH2 a été inhibé (Figure 42E). EZH2 pourrait donc être impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules de CCS.

L'inhibition pharmacologique de EZH2 induit une diminution de prolifération avec un arrêt du cycle en phase G2/M et une augmentation de l'apoptose

La transfection des siARN dans les cellules H295R s'accompagne de la mort de près de la moitié des cellules, empêchant d'évaluer le taux d'apoptose en réponse à l'inhibition de EZH2 par cette technique. De plus, les siARN ne pourront pas être utilisés sur un modèle murin de CCS, afin d'analyser l'impact de l'inhibition de EZH2 sur la progression tumorale *in vivo*. Nous avons donc testé l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de EZH2, le 3-Deazaneplanocin A (DZNep).

Les cellules H295R ont été traitées pendant 5 jours avec 3 doses de DZNep (0,5 ; 1,0 et 5,0  $\mu$ M). L'efficacité du DZNep a été évaluée en mesurant l'accumulation de la protéine EZH2 et de sa marque épigénétique cible H3K27me3, en western blot. Dès 0,5 $\mu$ M, une diminution d'expression de la protéine EZH2 et de la marque H3K27me3 est observée (Figure 43A et B). Le taux de prolifération des cellules H295R traitées avec 0,5 ; 1,0 ou 5,0 $\mu$ M de DZNep est significativement diminué par rapport aux cellules ayant reçu le traitement contrôle (DMSO) (Figure 43C). La diminution de prolifération étant plus marquée pour la dose de 5 $\mu$ M de DZNep, la suite des expériences a été réalisée avec cette concentration. Une analyse par cytométrie en flux après incorporation de iodure de propidium a été réalisée sur les cellules H295R après traitement. La proportion des cellules en phase G0/G1 est diminuée avec l'inhibition de EZH2 par le DZNep alors qu'elle augmente en phase G2/M par rapport aux cellules ayant reçu le traitement contrôle (Figure 43D). Le DZNep induit donc un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. L'inhibition de EZH2 par cet inhibiteur pharmacologique n'a donc pas le même impact sur le cycle que l'inhibition de EZH2 par siARN. Cet arrêt du cycle cellulaire s'accompagne, dans les cellules traitées au DZNep, d'une diminution significative de l'accumulation des transcrits *Cycline D2*, *Cycline E*, *Cycline A2* et *Cycline B2* (Figure 43E).





**Figure 43 : L'inhibition pharmacologique de EZH2 dans les cellules H295R induit une diminution de prolifération avec un arrêt du cycle en phase G2/M.**

**A/** Analyse de l'accumulation de la protéine EZH2. La protéine EZH2 a été détectée par Western blot sur des extraits protéiques de cellules H295R traitées avec du DMSO (contrôle) ou du DZNep (0,5  $\mu$ M ; 1,0  $\mu$ M ou 5,0  $\mu$ M). Les niveaux d'expression de EZH2 ont été normalisés par rapport à l'actine. L'histogramme représente la quantification de trois expériences indépendantes.

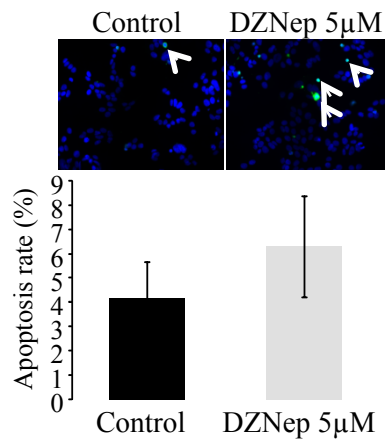
**B/** Analyse de la marque H3K27me3. H3K27me3 a été détectée par Western blot à partir des protéines extraites des cellules H295R traitées au DMSO ou au DZNep. Les niveaux de H3K27me3 ont été normalisés par rapport à H3. L'histogramme représente la quantification de trois expériences indépendantes.

**C/** Niveau de prolifération des cellules H295R. Après cinq jours de traitement (DMSO ou DZNep) les cellules ont été comptées. Le graphique représente le taux de prolifération par rapport au nombre de cellules ensemencées au départ et exprimé par rapport à la condition contrôle (DMSO). Ces expériences ont été réalisées trois fois.

**D/** Analyse du cycle cellulaire des cellules H295R après cinq jours de traitement. Le graphique représente le pourcentage de cellules en phase G0/G1, G2/M et S après cinq jours de transfection.

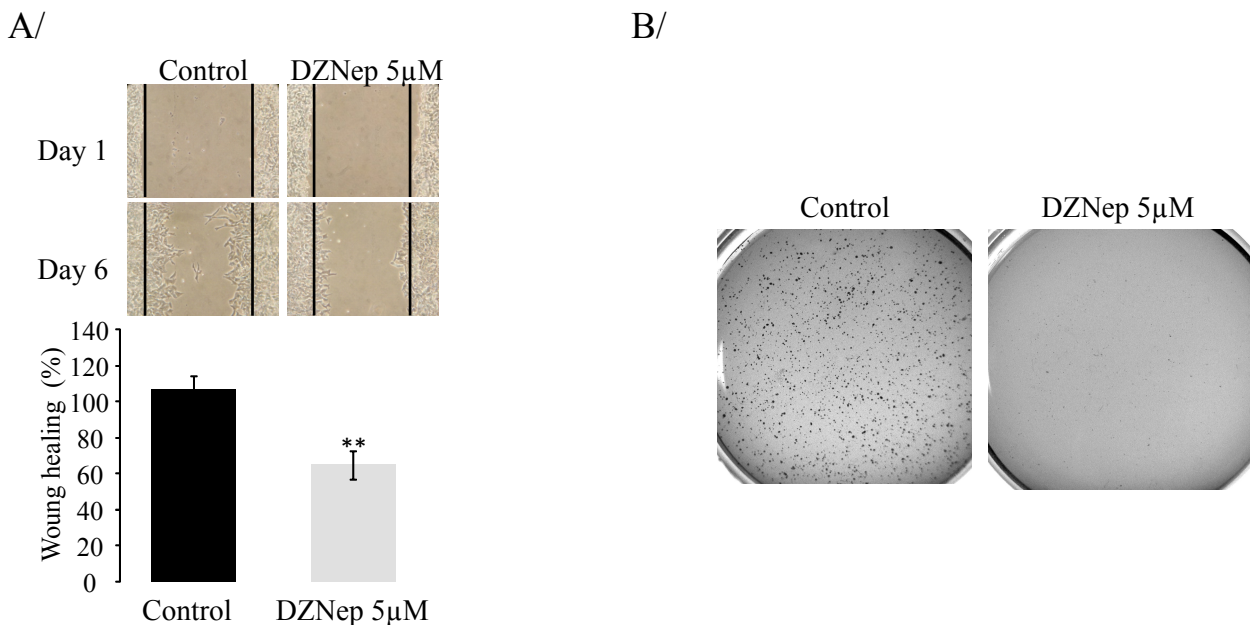
**E/** Quantification relative des transcrits des gènes *CyclineD2*, *CyclineE*, *CyclineA2* et *CyclineB2*. La normalisation a été réalisé par rapport à l'expression du gène *Actine*. Les cellules H295R ont été traitées cinq jour avec du DMSO (contrôle) ou du DZNep (5  $\mu$ M).

Test t de Student, \* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$



**Figure 44 : Le DZNep augmente l'apoptose des cellules H295R.**

Analyse de l'apoptose des cellules H295R. Après deux jours de traitement contrôle (DMSO) ou DZNep à 5µM, un marquage TUNEL a été réalisé. Sur l'image, les flèches blanches indiquent les cellules marquées (cellules apoptotiques). Le graphique représente la quantification des cellules apoptotiques pour trois expériences indépendantes.



**Figure 45 : L'inhibition pharmacologique de EZH2 réduit les capacités oncogéniques des cellules H295R.**

A/ Analyse de la migration. Après 5 jours de traitement (DMSO ou DZNep), le comblement de la blessure a été quantifié. Les résultats de la quantification pour trois expériences indépendantes sont représentés par le graphique.

B/ Formation de colonies en soft-agar. Les cellules ont étéensemencées en soft agar après deux jours de traitement (DMSO ou DZNep 5µM). Après 15 jours de croissance, les colonies ont été fixées et colorées au cristal violet.

Test t de Student, \* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Afin de déterminer si la diminution du taux de prolifération pouvait s'accompagner d'une augmentation de la mort cellulaire, nous avons quantifié l'apoptose des cellules H295R. Après traitement des cellules au DZNep ou au DMSO (contrôle) durant deux jours, un marquage TUNEL a été réalisé afin de mettre en évidence les cellules apoptotiques. Le comptage des cellules apoptotiques montre une augmentation du taux d'apoptose avec le traitement DZNep par rapport aux cellules contrôles (Figure 44). Le DZNep permet donc d'inhiber la prolifération et d'augmenter l'apoptose des cellules H295R *in vitro*.

#### Le DZNep inhibe les caractéristiques agressives des cellules H295R.

Nous avons ensuite évalué l'effet du DZNep sur la capacité de migration des cellules H295R. Après avoir réalisé une blessure sur un tapis cellulaire confluent, les cellules ont été traitées pendant 5 jours avec du DZNep ou le traitement contrôle. Les cellules traitées au DZNep présentent une capacité de comblement significativement réduite d'environ 40% par rapport aux cellules contrôles (Figure 45A).

D'autre part, la capacité des cellules à proliférer en absence de contact a été évaluée par un test de formation de colonies en milieu semi-liquide, le soft-agar. Les cellules ont été traitées durant deux jours avant d'êtreensemencées dans le soft-agar, puis tout au cours de la pousse. Après 15 jours de croissance, nous pouvons observer que le nombre et la taille des clones sont fortement réduits avec le traitement DZNep par rapport au traitement contrôle (Figure 45B), suggérant que le traitement au DZNep restaure l'anoikis.

#### Cibles potentielles de EZH2 dans les CCS

Afin d'identifier les cibles potentielles de EZH2 dans les CCS, son expression a été corrélée à l'expression de l'ensemble des gènes présents dans le transcriptome de la cohorte de l'université du Michigan (Giordano et al., 2003). Le dendrogramme (Figure 46) présente les gènes co-dérégulés avec EZH2 avec une p-value <0.00001. Malgré l'effet inhibiteur supposé de EZH2, l'expression d'une majorité des gènes présents dans cette analyse est corrélée positivement à celui-ci. Ceci suggère que soit ces gènes ne sont pas des cibles directes de EZH2, soit que l'action de EZH2 dans les cortico-surrénalomes ne repose pas sur le complexe répresseur PRC2. Conformément à nos analyses *in vitro*, montrant un effet de EZH2 sur la



prolifération cellulaire, l'analyse met en évidence une co-dérégulation de EZH2 avec les gènes codant les cyclines B1 (*CCNB1*), B2 (*CCNB2*) et A2 (*CCNA2*) ainsi qu'avec la kinase associée aux cyclines *CDK1* (Cyclin dependent kinase 1) (Figure 46). De nombreux gènes impliqués dans la réplication de l'ADN sont également co-dérégulés avec EZH2, comme les gènes codant les protéines MCM (Minichromosome maintenance, *MCM7*, *MCM3*, *MCM2*, *MCM5*, *MCM10* et *MCM4*) et les gènes *CDC6* et *CDC45* (Cell Division Cycle 6 et 45) (Figure 46). L'analyse de l'expression des gènes co-dérégulés met également en évidence des altérations dans l'expression de nombreux facteurs impliqués dans la mitose et la séparation des chromosomes (*CDC25c*, *CDCA8*, *CDCA2*, *CDCA5*, *BUB1*, *BUB1B*, *CASC5* et de nombreux membres de la famille des Kinésines) (Figure 46). L'analyse met également en évidence une association entre surexpression de EZH2 et surexpression de l'inhibiteur d'apoptose *BIRC5* qui pourrait jouer un rôle dans l'effet inhibiteur de EZH2 sur l'apoptose. Enfin, l'expression de *CDCA7* qui est impliqué dans la clonogénicité des cellules lymphoblastiques (Prescott et al., 2001) est également associée à EZH2. Il pourrait être un candidat intéressant pour rendre compte de l'effet du DZNep sur la capacité des cellules H295R à former des colonies en soft agar.

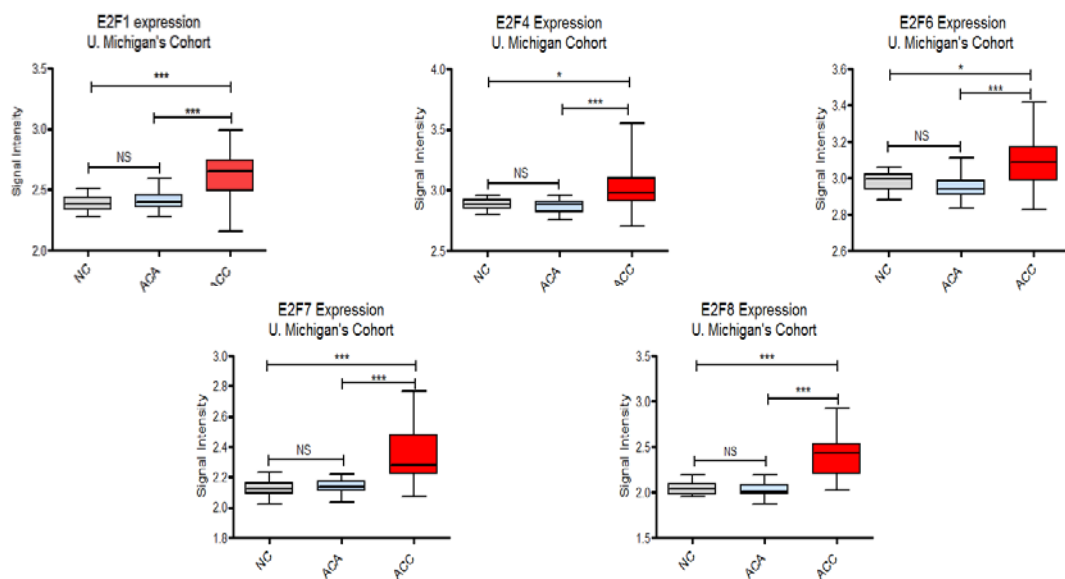
#### L'expression de EZH2 dans les CCS pourrait être régulée par les facteurs de transcription E2F

Afin d'identifier des acteurs potentiels de la surexpression de EZH2 dans les corticosurrénalomes, nous avons cherché à identifier des facteurs de transcription parmi les gènes co-dérégulés avec EZH2 chez les patients. Cette analyse a mis en évidence une corrélation positive entre *E2F2*, *HELLS* et *EZH2* (Figure 46). Les facteurs de transcription E2F sont capables de stimuler l'expression de *EZH2* dans des fibroblastes (Bracken et al., 2003). *HELLS* code une hélicase qui coopère avec E2F3A pour la régulation de gènes cibles E2F3 (von Eyss et al., 2012). Ces observations suggéraient donc que l'expression de *EZH2* dans la cortico-surrénale pourrait être sous le contrôle des facteurs de transcription E2F.

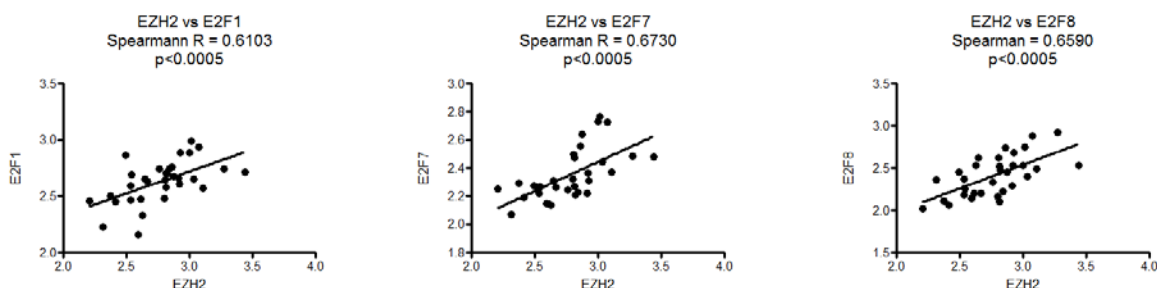
Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé l'expression des facteurs E2F1 à E2F8 à partir des données du transcriptome des patients (Giordano et al., 2003). Ces analyses montrent que les facteurs de transcription E2F1, E2F4, E2F6, E2F7 et E2F8 sont surexprimés dans les CCS par rapport aux ACS et aux tissus sains (Figure 47A). Toutefois seule l'expression des facteurs E2F1, E2F7 et E2F8 est corrélée à l'expression de EZH2 dans les



A/



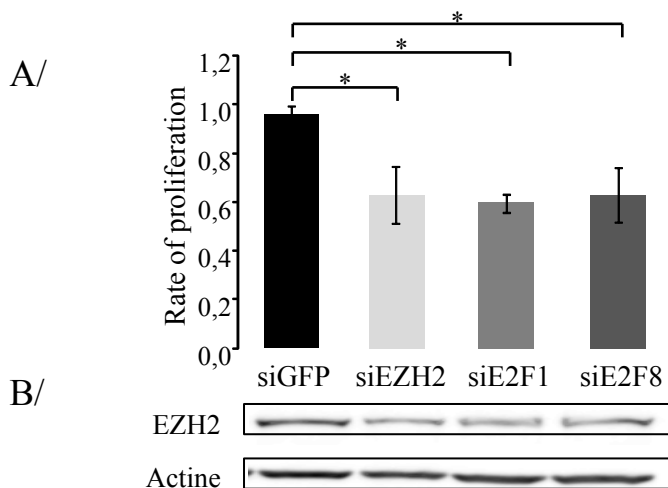
B/



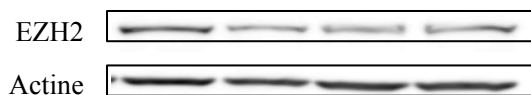
**Figure 47 : L'expression de *EZH2* pourrait être régulée par les facteurs de transcription E2F.**

A/ Analyse de l'expression des facteurs de transcription *E2F1*, *E2F4*, *E2F6*, *E2F7* et *E2F8* à partir des données du transcriptome des patients de la cohorte « Michigan » (Giordano et al., 2008).

B/ Analyse de la corrélation entre l'expression de *EZH2* et les facteurs *E2F1*, *E2F7* ou *E2F8* pour les CCS de la cohorte « Michigan » (Giordano et al., 2008).



B/



**Figure 48 : L'inhibition des facteurs de transcription E2F1 et E2F8 induit une diminution de prolifération des cellules H295R et est associée à la diminution de l'accumulation de *EZH2*.**

A/ Niveau de prolifération des cellules H295R. Les cellules ont été comptées cinq jours après transfection des siGFP, siEZH2, siE2F1 ou siE2F8. Le graphique représente le taux de prolifération par rapport au nombre de cellules ensemencées au départ et exprimé par rapport à la condition contrôle (siGFP). Ces expériences ont été réalisées trois fois.

B/ Analyse de l'accumulation de la protéine EZH2. La protéine EZH2 a été détectée par Western blot sur des extraits protéiques de cellules H295R transfectées avec un siARN contrôle (siGFP), dirigé contre EZH2 (siEZH2), dirigé contre E2F1 (siE2F1) ou dirigé contre E2F8 (siE2F8). L'actine sert de contrôle de charge.

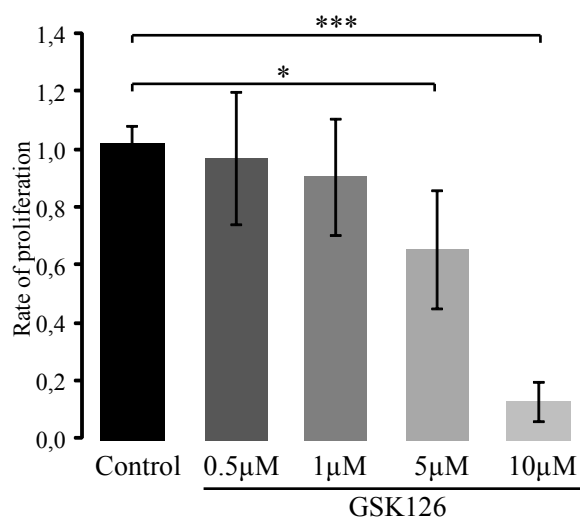
Test t de Student, \* $p \leq 0.05$ .

CCS (Figure 47B). Ces trois facteurs de transcription pourraient donc être des acteurs de la régulation de EZH2 dans la cortico-surrénale. Toutefois, l'analyse de leur expression par RTqPCR sur des échantillons de patients a mis en évidence une quasi absence de E2F7 dans la cortico-surrénale humaine ( $Ct = 30,2 \pm 1,7$  pour E2F7;  $Ct = 22,9 \pm 1,2$  pour E2F1 et  $Ct = 28,6 \pm 2,2$  pour E2F8). Nous avons donc focalisé la suite de notre étude sur E2F1 et E2F8.

Afin de déterminer si ces deux facteurs régulent l'expression de EZH2 dans les CCS, nous avons inhibé leur expression par siARN dans les cellules H295R. La transfection des siARN dirigés contre E2F1 ou E2F8 induit une diminution significative de prolifération des cellules H295R par rapport aux cellules transfectées avec le siARN contrôle (siGFP) (Figure 48A). Cette réduction du taux de prolifération des cellules H295R en réponse à l'inhibition de E2F1 ou E2F8 est similaire à celle observée lors de l'inhibition de EZH2 par siARN (Figure 48A). Les facteurs de transcription E2F1 et E2F8 semblent donc impliqués dans la prolifération des cellules de CCS humain. L'analyse par western blot de l'accumulation de la protéine EZH2 suite à l'inhibition de E2F1 ou de E2F8 met en évidence une diminution de EZH2 (Figure 48B). Ce résultat suggère que les facteurs E2F1 et E2F8 pourraient être impliqués dans le contrôle de l'expression de EZH2 dans les cellules cortico-surrénaliennes.

## **Conclusion et discussion**

Les analyses des données du transcriptome montrent que EZH2 est surexprimé et associé à un mauvais pronostic dans les CCS. L'expression de EZH2 est corrélée à celle du marqueur de prolifération PCNA, suggérant un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes. Ceci est confirmé par nos analyses *in vitro*, où l'inhibition de EZH2 par siARN ou par un inhibiteur pharmacologique, le DZNep, induit une diminution de la prolifération des cellules H295R. De plus, les traitements DZNep augmentent l'apoptose et réduisent les capacités de migration et de prolifération de ces cellules en milieu semi-liquide. EZH2 semble donc contrôler la prolifération, l'apoptose, la migration et la clonogénicité des cellules H295R. EZH2 pourrait donc être un acteur de la tumorigenèse cortico-surrénalienne.



**Figure 49 : Le GSK126 induit une diminution de prolifération des cellules H295R.**

Niveau de prolifération des cellules H295R. Après cinq jours de traitement DMSO (contrôle) ou GSK126 aux doses indiquées, les cellules ont été comptées. Le graphique représente le taux de prolifération par rapport au nombre de cellulesensemencées au départ et exprimé par rapport à la condition contrôle (DMSO). Ces expériences ont été réalisées trois fois.

Test t de Student, \* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$

### Différence d'effets entre siARN dirigé contre EZH2 et DZNep.

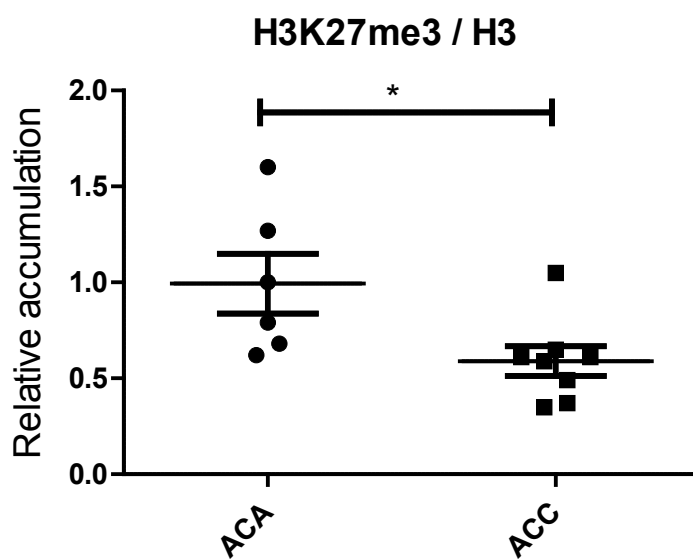
L'inhibition de EZH2 par siARN ou par l'inhibiteur pharmacologique DZNep, réduit l'expression de la protéine EZH2 et de la marque H3K27me3 et inhibe la prolifération des cellules H295R. Toutefois ces deux approches n'induisent pas le même effet sur le cycle cellulaire. En effet, les analyses du cycle montrent un arrêt en phase G0/G1 lors de l'inhibition de EZH2 par siARN, alors que l'arrêt du cycle se produit en phase G2/M avec le traitement au DZNep. Alors que la transfection du siARN dirigé contre EZH2 est spécifique, le DZNep est un inhibiteur de la S-adenosylhomocystéine hydrolase, induisant le blocage du cycle de la méthionine et donc inhibant les méthyltransférases en général. Cette molécule n'est donc pas spécifique de EZH2 et l'activité d'autre HMTases est altérée par ce traitement (Lee and Kim, 2013). Cette différence peut donc expliquer une réponse cellulaire différente, en fonction de l'approche utilisée pour inhiber EZH2. Ainsi, dans des cellules tumorales mammaires MCF-7, l'inhibition de EZH2 par siARN ou par le DZNep induit une réexpression de gènes différents, en fonction de l'approche utilisée (Tan et al., 2007). Le DZNep pouvant affecter d'autres acteurs que EZH2, les effets observés suite au traitement ne peuvent être attribués uniquement à EZH2. La transfection de siARN ne nous permettant pas d'évaluer l'apoptose ou la migration et ne pouvant être utilisée *in vivo*, il est nécessaire de disposer d'un inhibiteur pharmacologique pour ces utilisations. Récemment, un inhibiteur très spécifique de EZH2 a été développé, le GSK126 (McCabe et al.). Nos résultats préliminaires montrent une diminution significative du taux de prolifération des cellules H295R après 5 jours de traitement avec 5µM de cette molécule (Figure 49). Toutefois, nous avons pu observer une variabilité dans la réponse des cellules à ce traitement. Il est donc nécessaire de confirmer ces résultats.

### Contrôle de l'expression de EZH2 dans les CCS

L'expression de EZH2 dans les CCS pourrait être sous le contrôle de facteurs de transcription E2F. En effet l'expression de E2F1 et E2F8 est augmentée dans les CCS humains et corrélée à l'expression de EZH2. De plus, leur inhibition en cellules H295R induit une diminution de prolifération et s'accompagne d'une réduction de l'accumulation de la protéine EZH2. EZH2 pourrait donc être une cible des facteurs de transcription E2F1 et E2F8. La diminution de prolifération et d'accumulation de EZH2 est similaire que l'on inhibe E2F1 ou E2F8, suggérant que ces deux facteurs pourraient agir de concert pour stimuler



l'expression de EZH2. Il a été mis en évidence, par des expériences de GST pull down et d'immunoprécipitation, que E2F1 et E2F8 pouvaient interagir directement (Liu et al., 2013). Toutefois, E2F8 est principalement décrit comme un répresseur transcriptionnel (Iaquinta and Lees, 2007; Moon and Dyson, 2008). En effet, dans des cellules hépatiques humaines HepG2, E2F1 et E2F8 sont recrutés sur les même promoteurs, mais E2F8 agit comme un répresseur de la transcription de ces gènes (Pandit et al., 2012). De plus, dans un modèle murin d'inactivation de *E2f8* spécifiquement dans le foie, une augmentation d'expression de gènes cibles E2F est observée (Pandit et al., 2012). L'inactivation de *E2f1* dans ce modèle murin supprime l'augmentation d'expression de ces gènes, suggérant des actions antagonistes de E2F1 et E2F8 sur les mêmes gènes (Pandit et al., 2012). Les effets des E2F pourraient toutefois être spécifiques du tissu ou des cellules considérées. En effet, alors que E2F8 est capable de réguler négativement l'expression de E2F1 dans des cellules de rein embryonnaire HEK-293 (Christensen et al., 2005), cette régulation n'est pas observée dans des cellules humaines de foie Huh7 et PLC/PRF/5 (Deng et al., 2010). De même, alors que l'expression ectopique de E2F8 dans des cellules fibroblastiques humaines induit une inhibition de prolifération, ce facteur de transcription est surexprimé dans les hépatocarcinomes et augmente la prolifération des cellules hépatiques PLC/PRF/5 en culture et xénogreffe (Deng et al., 2010). Il n'est donc pas exclu que dans la cortico-surrénale, ces deux E2F puissent agir ensemble pour stimuler l'expression de EZH2. Une autre hypothèse peut reposer sur une action séquentielle de ces deux facteurs. E2F8 étant une cible transcriptionnelle de E2F1 (Christensen et al., 2005), on peut donc supposer que l'augmentation d'expression de E2F1 dans les CCS induit l'expression de E2F8, qui serait capable de stimuler la transcription de EZH2. En effet, même si E2F8 est principalement décrit comme un répresseur transcriptionnel, un effet de E2F8 comme activateur transcriptionnel a été décrit pour le gène *Cycline D1* dans des hépatocytes (Deng et al., 2010) et pour le gène *VEGFA* dans des cellules HeLa (Weijts et al., 2012). D'autre part, nous n'avons pas établi si EZH2 est une cible directe des facteurs E2F. Dans des cellules HEK-293T, des expériences de transfection de gènes rapporteurs semblent indiquer que E2F1 est capable de réguler directement l'expression de *EZH2* (Bracken et al., 2003). Ces données sont renforcées par des expériences de ChIP dans des cellules fibroblastiques humaines, démontrant le recrutement de E2F1 au niveau du promoteur de *EZH2* (Iannetti et al., 2014). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que les E2F1 et 8 induisent l'expression d'un facteur intermédiaire responsable du contrôle de l'expression de EZH2.



**Figure 50 : Accumulation de la marque H3K27me3 dans les ACS et CCS.**

L'accumulation de la marque H3K27me3 a été évaluée par Western blot sur des extraits protéiques d'adénomes (ACA, n = 6) et de carcinomes corticosurrénaux (ACC, n = 8). Les niveaux d'accumulation de la marque H3K27me3 ont été normalisés par l'accumulation de l'histone H3.

Test t de Student, \* $p \leq 0.05$ .

### Cibles de EZH2 dans les CCS ?

Nos résultats suggèrent l'implication de EZH2 dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Son rôle pourrait passer, entre autres, par le contrôle de la prolifération et de l'apoptose. En effet, sa surexpression est associée à l'expression de PCNA dans les CCS humains et son inhibition *in vitro* réduit la prolifération et stimule l'entrée en apoptose des cellules H295R. L'analyse de corrélation reposant sur le transcriptome de patients (Figure 46) suggère que EZH2 est co-dérégulé avec de nombreux acteurs de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. L'ensemble de ces facteurs pourrait constituer des cibles pertinentes de EZH2 dans les CCS. Il reste toutefois à confirmer l'implication de EZH2 dans le contrôle de leur expression. Dans des cellules cancéreuses mammaires ou de l'ovaire, EZH2 inhibe l'expression du gène *p57<sup>Kip2</sup>* codant un inhibiteur du cycle cellulaire (Guo et al., 2011; Yang et al., 2009). Celui-ci est localisé au locus 11p15.5 (locus IGF2) et voit son expression diminuer dans les CCS (Bourcigaux et al., 2000). Il pourrait donc être une autre cible intéressante de EZH2 dans les CCS.

Les données obtenues par la corrélation de l'expression de EZH2 avec l'ensemble des gènes présents dans le transcriptome de la cohorte de l'université du Michigan (Giordano et al., 2003) montrent, de manière étonnante, que la majorité des gènes ont leur expression corrélée positivement à l'expression de EZH2 ( $p < 0.00001$ ) (Figure 46). Ceci suggère un rôle de EZH2 dans l'activation de la transcription. Au sein du complexe PRC2, EZH2 est associé à la répression de la transcription. Toutefois, EZH2 possède également la capacité, indépendamment du complexe PRC2, de stimuler certains facteurs de transcription. Ceci a notamment été décrit pour le récepteur des androgènes AR (Androgen receptor) dans des cellules de cancer de la prostate hormonaux-indépendant (Xu et al., 2012), pour STAT3 dans des cellules de glioblastome (Kim et al., 2013) ou encore pour la  $\beta$ -caténine et le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  (Estrogen Receptor  $\alpha$ ) dans des cellules tumorales mammaires (Shi et al., 2007). La phosphorylation de EZH2 sur sa sérine 21 semble nécessaire pour cette activité de stimulation de la transcription (Kim et al., 2013; Xu et al., 2012). Cette phosphorylation, pouvant être réalisée par AKT, induit une perte de l'activité histone méthyltransférase et donc une diminution de la marque H3K27me3 (Cha et al., 2005). L'évaluation de cette marque par Western blot dans un petit échantillon d'adénomes et de carcinomes cortico-surréniens, disponibles au laboratoire, met en évidence une diminution de l'accumulation de la marque H3K27me3 dans les CCS par rapport au ACS (Figure 50). Ainsi dans les CCS, EZH2 pourrait agir plutôt indépendamment du complexe PRC2 et favoriser la transcription. Cette hypothèse





permettrait de rendre compte de l'augmentation de l'expression de nombreux gènes, associée à la surexpression de EZH2 dans les CCS. Toutefois, une augmentation de l'expression des facteurs de transcription E2F étant observée dans les CCS, ces facteurs pourraient également être à l'origine de l'augmentation de la transcription des gènes observée dans l'analyse du transcriptome. La corrélation positive de l'expression de ces gènes et de l'expression de EZH2 serait alors liée au fait que EZH2 est lui-même une cible des facteurs E2F.



# PERSPECTIVES



Les CCS sont des tumeurs malignes rares avec 0.5 à 2 nouveaux cas par an et par million, mais ces tumeurs sont associées à un mauvais pronostic avec une survie à 5 ans inférieure à 40% (Abiven et al., 2006; Icard et al., 2001). Le seul traitement curatif des CCS repose sur l'exérèse complète de la tumeur primaire. Toutefois, environ 80% des patients ayant subi cette chirurgie présenteront une récurrence (Fay et al., 2014). De plus, au moment du diagnostic, près de 50% des patients présentent des métastases (Else et al., 2014). Une thérapie adjuvante au mitotane peut alors être proposée, mais le mitotane entraîne de nombreux effets secondaires et ne conduit pas à une réponse thérapeutique durable (Berruti et al., 2008). Il est donc nécessaire d'identifier les altérations à l'origine du développement et de la progression tumorale cortico-surrénalienne afin de développer des stratégies thérapeutiques ciblées plus efficaces.

Les deux altérations les plus fréquentes dans les CCS sont la surexpression du facteur de croissance IGF2 (90% des cas) (Gicquel et al., 1997b; Giordano et al., 2003) et l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (39% des CCS) (Gaujoux et al., 2011). Notre équipe a démontré que la  $\beta$ -caténine est un oncogène surrénalien, mais que d'autres altérations doivent être nécessaires pour la progression maligne (Berthon et al., 2010). Nous avons mis en évidence que IGF2 seul n'initie pas la tumorigenèse cortico-surrénalienne et que sa surexpression associée à l'activation de la  $\beta$ -caténine dans le cortex surrénalien n'a qu'un effet modéré sur la progression maligne (Drelon et al., 2012). Afin d'identifier de nouvelles altérations, une analyse rétrospective du transcriptome de deux cohortes indépendantes de CCS a été réalisée. Celle-ci a mis en évidence une surexpression de l'HMTase EZH2, associée à un mauvais pronostic. Nos données *in vitro* suggèrent que EZH2 est impliqué dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose, dans la migration et la clonogénicité des cellules de CCS humain H295R.

#### **A/ Contrôle de l'expression de EZH2 dans les CCS**

Afin d'identifier les facteurs pouvant expliquer la surexpression de EZH2 dans les CCS, nous avons cherché à identifier les facteurs de transcription co-dérégulés avec EZH2 chez les patients. Nous avons identifié une corrélation positive entre *E2F2*, *HELLS* (code une hélicase impliquée dans la régulation de gènes cibles E2F3) et *EZH2*. Les facteurs de transcription E2F sont des acteurs intéressants pour le contrôle de l'expression de *EZH2*. En effet, les E2F ont été décrits comme des régulateurs positifs de l'expression de EZH2 dans des



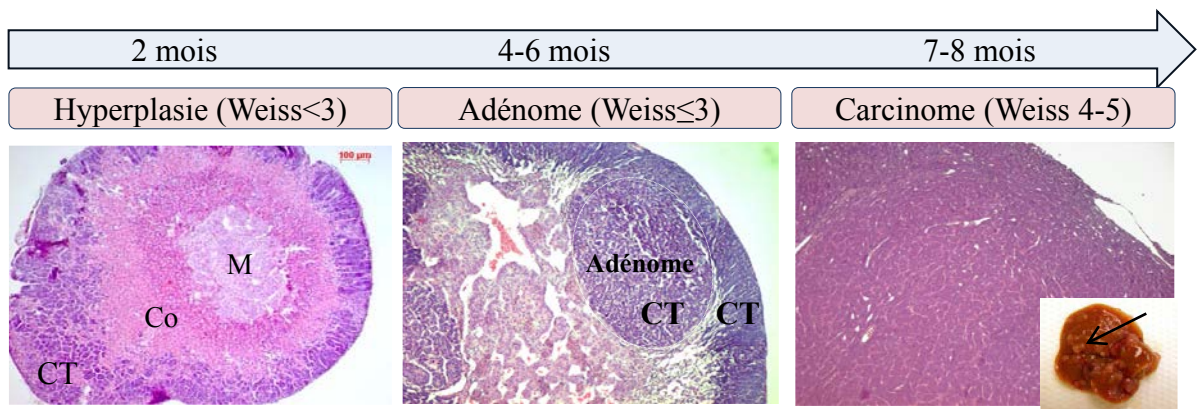
cellules fibroblastiques (Bracken et al., 2003). L'analyse de l'expression des facteurs *E2F1* à *E2F8* à partir des données du transcriptome de l'université du Michigan (Giordano et al., 2003) a mis en évidence une surexpression de *E2F1* et *E2F8* et une corrélation positive entre leur expression et l'expression de *EZH2* dans les CCS. De plus, leur invalidation par siARN dans les cellules H295R induit une diminution de l'accumulation de la protéine EZH2. Ces résultats *in vitro* devront être confirmés et l'accumulation des transcrits *EZH2* suite à l'inhibition de *E2F1* et de *E2F8* devra également être analysée.

*E2F1* et *E2F8* peuvent interagir physiquement (Liu et al., 2013) et sont recrutés sur les même promoteurs dans les cellules HepG2 (Pandit et al., 2012). Ces deux facteurs de transcription pourraient donc agir ensemble sur l'expression de *EZH2*. Néanmoins, *E2F8* étant décrit comme une cible transcriptionnelle de *E2F1* (Christensen et al., 2005), une action séquentielle de ces deux facteurs de transcription est envisageable. L'expression de *E2F8* sera donc analysée dans les cellules H295R après inhibition de *E2F1* par siARN. En fonction des résultats, des expériences de ChIP pourront être menées afin de déterminer si *E2F1* est recruté sur le promoteur de *E2F8* et si *E2F8* est recruté au niveau du promoteur de *EZH2*, ou bien si *E2F1* et *E2F8*, sont tous les deux recrutés au niveau du promoteur de *EZH2*.

## **B/ Implication de EZH2 dans la prolifération, l'apoptose, la migration et la clonogénicité des cellules H295R**

Nos analyses *in vitro* ont montré que l'inhibition de EZH2 par siARN ou par un inhibiteur pharmacologique, le DZNep, induit une diminution de prolifération des cellules H295R. Toutefois, alors que les analyses du cycle cellulaire montrent un arrêt en phase G0/G1 pour le siARN dirigé contre EZH2, l'arrêt du cycle a lieu en phase G2/M pour le DZNep. Ce résultat souligne le fait que le DZNep n'est pas un inhibiteur spécifique de EZH2. Ainsi, les effets que nous observons suite au traitement des cellules H295R avec le DZNep ne peuvent être attribués uniquement à EZH2. L'utilisation du siARN dirigé contre EZH2 ne permettant pas de réaliser l'ensemble des tests (mesure de l'apoptose, de la migration), la démonstration de l'implication de EZH2 dans ces processus devra être effectuée par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de EZH2, le GSK126. Nos résultats préliminaires montrent que le traitement des cellules H295R avec du GSK126 induit une diminution prolifération de ces cellules. Les tests de prolifération, d'apoptose, de migration et de formation de colonies en soft agar seront donc répétés sur les cellules H295R, traitées avec





**Figure 51 : Tumorigenèse cortico-surrénalienne dans les souris AdTag.**

L'expression de l'AgT dans la cortico-surrénale induit le développement de carcinome. La formation de ces CCS est progressive avec une hyperplasie à 2 mois, puis l'apparition d'adénomes à 4-6 mois et enfin des CCS avec présence de métastases hépatiques et pulmonaires.

Co : Cortex ; M : Medulla ; CT : cellules tumorales.

La flèche indique une métastase hépatique.



**Figure 52 : Surexpression de *Ezh2* dans les surrénales des souris AdTag.**

Quantification relative de l'expression de *Ezh2* par RTqPCR dans les surrénales des souris AdTag et contrôles de 2, 4 et 6 mois. Le graphique représente la quantité relative d'ARNm chez 7 souris AdTag par rapport à 7 souris contrôles. Les moustaches correspondent au minimum et maximum des valeurs. La barre représente la médiane tandis que la boîte est bornée par le premier et le troisième quartile.

Test t de Student, \*  $p \leq 0.05$  ; \*\*  $p \leq 0.01$  ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

des doses de 0,5 à 10 $\mu$ M de GSK126. A l'issue de ces expériences nous devrions avoir confirmé l'implication de EZH2 dans l'acquisition de caractéristiques agressives dans les cellules H295R.

### **C/ Rôle de EZH2 dans la croissance tumorale et évaluation de l'effet curatif des molécules inhibant EZH2 *in vivo***

Afin de compléter nos analyses *in vitro* et de proposer un ciblage pré-clinique, le rôle de EZH2 dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose sera également démontré *in vivo*. Pour cela, nous utiliserons un modèle de xénogreffes de cellules H295R dans des souris immunodéficientes. L'activité méthyltransférase de EZH2 sera inhibée grâce à des injections intra-péritonéales de GSK126, peu utilisé *in vivo* jusqu'à maintenant et de DZNep, pour lequel les conditions d'utilisation standard *in vivo* sont mieux définies. Ces modèles nous permettront d'évaluer le rôle de EZH2 dans la croissance de cellules tumorales humaines. Cependant, ces expériences reposent sur une seule lignée cellulaire et le site d'implantation des cellules ne reproduit pas fidèlement le micro-environnement tumoral de la cortico-surrénale. Ainsi, afin de valider l'effet curatif des molécules inhibant EZH2, cette expérience devra être conduite dans un modèle murin de CCS. Nous disposons au laboratoire des souris AdTag. Ces souris transgéniques expriment l'antigène T de SV40 spécifiquement dans le cortex surrénalien, grâce aux régions régulatrices de *Akr1b7* (Ragazzon et al., 2006). L'antigène T agit en inhibant Rb et p53, dont l'inactivation a été impliquée dans les CCS humains (Assié et al., 2014). Les souris AdTag développent progressivement des tumeurs malignes métastatiques (foie et poumon) (7-8 mois), en passant par des hyperplasies (1-2 mois) et des adénomes (4-6 mois) (Figure 51, résultats non publiés, Marie Batisse-Lignier). Ce modèle présente l'intérêt de surexprimer EZH2 dès les stades précoces de la tumorigenèse (Figure 52, résultats non publiés, Mickael Mathieu). Elles sont donc un bon modèle pour évaluer l'implication de EZH2 dans la progression tumorale et tester l'effet curatif de l'inhibition de EZH2, dans un contexte tumoral plus proche des CCS humains. L'ensemble de ces expériences permettra de valider l'implication de EZH2 dans le développement de CCS et de proposer son ciblage thérapeutique avec des molécules pharmacologiques.

En plus du GSK126, un nouvel inhibiteur très spécifique de EZH2 est disponible, le EPZ-6438 (Knutson et al., 2013). Cette molécule inhibe la prolifération des cellules de tumeurs rhabdoïdes et de lymphome non-hodgkinien en culture et en xénogreffes (Knutson et



al., 2013, 2014). Ce composé ayant été validé dans ces essais pré-cliniques, la société Epizyme, qui l'a développé, s'est associée à la société Eisai pour mettre en place un essai clinique de phase I et II (<http://www.epizyme.com/programs/ezh2-inhibitor/>). Cet essai, actuellement en cours, porte sur des patients souffrant de lymphome non-hodgkinien et des patients souffrant de tumeurs solides avancées (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01897571>). Il serait donc intéressant de pouvoir tester cette molécule sur les cellules H295R en culture et xénogreffe ainsi que dans le modèle AdTag. Si l'implication de EZH2 dans les CCS est confirmée, cet inhibiteur de EZH2 pourrait donc représenter une nouvelle thérapie pour ces tumeurs agressives.

#### **D/ Identification des cibles et du mode d'action de EZH2 dans les CCS**

L'analyse de corrélation entre expression de *EZH2* et expression de l'ensemble des gènes présents dans le transcriptome des patients met en évidence une majorité de gènes dérégulés positivement avec *EZH2*, suggérant que dans les CCS, EZH2 pourrait également agir comme un activateur transcriptionnel. Toutefois, *EZH2* tout comme un grand nombre des gènes co-dérégulés positivement semble être une cible des facteurs E2F. La corrélation positive entre *EZH2* et ces gènes pourrait donc être due aux facteurs E2F et non à un effet positif de EZH2 sur la transcription.

Le rôle activateur de EZH2 nécessite sa phosphorylation sur sa sérine 21, induisant une diminution de son activité HMTase au sein du complexe PRC2. Ceci se traduit par une diminution de la marque H3K27me3 (Cha et al., 2005; Kim et al., 2013; Xu et al., 2012). Nous avons observé une diminution de cette marque dans les CCS, suggérant que ce rôle d'activateur transcriptionnel de EZH2 pourrait être présent dans ces tumeurs. Cette hypothèse sera vérifiée par l'évaluation du niveau d'expression de EZH2, de sa phosphorylation sur la sérine 21 et de l'accumulation de la marque H3K27me3 sur des TMA (Tissue Micro Array) disponibles au près de Tom Giordano (Université du Michigan). Le rôle de EZH2 dans la stimulation de la transcription passe par son interaction avec des facteurs de transcription tels que AR ou STAT3 (Kim et al., 2013; Xu et al., 2012). Afin d'identifier les partenaires de EZH2 dans la cortico-surrénale, des expériences d'immunoprécipitation suivies par des analyses en spectrométrie de masse seront conduites. Dans ce but, des constructions plasmidiques de EZH2 muté ou sauvage seront transfectées dans des cellules H295R. Les mutations de EZH2 porteront sur la sérine 21 et conduiront à une modification phospho-



mimétique (S21D), ou phospho-inactive (S21A). Ceci nous permettra d'identifier les partenaires de EZH2 suivant son état de phosphorylation et donc suivant son activité, soit d'HMTase au sein du complexe PRC2, soit de co-activateur transcriptionnel. L'ensemble de ces expériences devrait permettre d'évaluer l'existence d'un mode d'action alternatif de EZH2 dans les CCS, en fonction de son état de phosphorylation et de son interaction avec des facteurs de transcription partenaires.

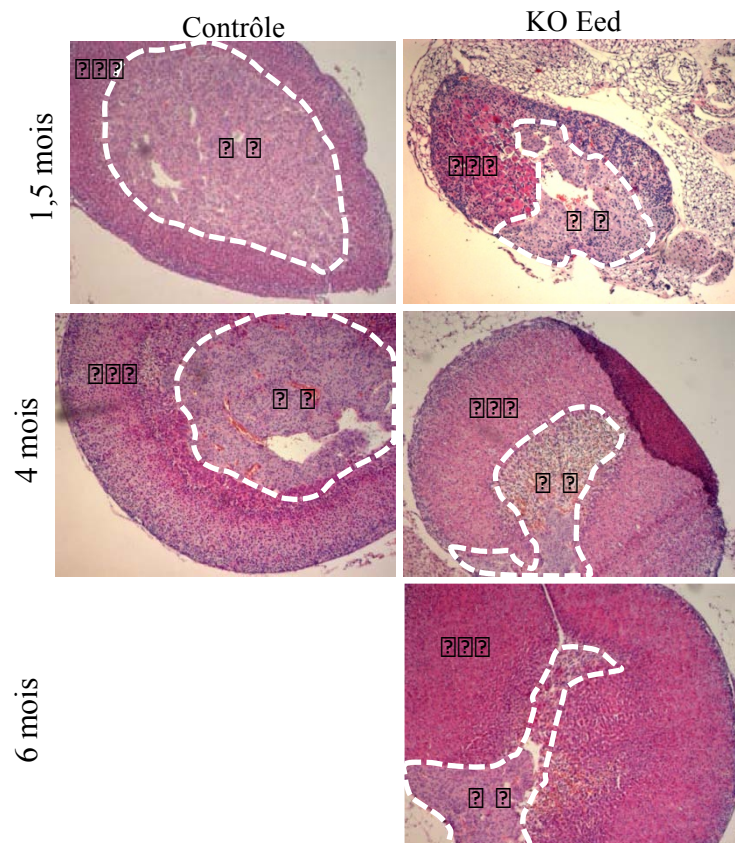
Afin d'identifier les gènes cibles de EZH2 quel que soit son mode d'action, nous effectuerons une analyse du transcriptome des cellules H295R après son inhibition par siARN et par le GSK126. Celle-ci sera complétée par des approches de ChIP sequencing, afin de déterminer les sites de liaison de EZH2 dans le génome des cellules H295R. Dans ce type d'expériences, nous pourrions identifier des cibles dépendantes de PRC2 (liaison de EZH2 et présence de la marque H3K27me3) et des cibles indépendantes de PRC2 (liaison de EZH2, absence de H3K27me3). Les données obtenues par l'ensemble de ces approches seront alors confrontées aux données des transcriptomes de patients. Ceci permettra d'identifier des cibles pertinentes de EZH2 dans le CCS et de relier leur dérégulation aux différents modes d'actions de ce facteur.

## **E/ Démonstration du rôle de EZH2 dans l'initiation et la progression tumorale *in vivo***

Nous proposons de mettre à profit les souris AdTag afin de déterminer le rôle et le mode d'action de EZH2 dans l'initiation et la progression tumorale *in vivo*. Dans ce but, nous allons invalider soit *Eed*, soit *Ezh2* dans la cortico-surrénale des souris AdTag.

*Eed* est nécessaire à l'activité du complexe PRC2 et donc à la mise en place de la marque H3K27me3 par EZH2 (Montgomery et al., 2005). Son invalidation permettra de mettre en évidence l'implication de *Ezh2* dans le processus oncogénique au travers du complexe PRC2. L'avantage de cette approche est de bloquer toutes les activités de type PRC2 qu'elles dépendent de *Ezh2* ou de son homologue *Ezh1* (Neff et al., 2012). L'invalidation de *Ezh2* (si elle n'est pas compensée par une surexpression de *Ezh1*) permettra de mettre en évidence le rôle de *Ezh2*, au travers de ses deux modes d'action.

Nous avons initialement choisi de croiser les souris portant des allèles floxés de *Eed* (Xie et al., 2014) ou de *Ezh2* (Su et al., 2003) avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de *Sfl* (Bingham et al., 2006). L'analyse des premières souris



**Figure 53 : Défaut développemental des surrénales des souris KO Eed.**

L'histologie des surrénales a été évaluée par une coloration hématoxyline/éosine sur des coupes de souris contrôles et invalidées pour *Eed* (KO Eed). La medulla est délimitée par la zone pointillée.

Co : Cortex ; M : Medulla.

Sf1:Cre;Eed<sup>Fl/Fl</sup> a mis en évidence une hypoplasie surrénalienne marquée caractérisée chez certaines souris par la présence d'une surrénale diffuse. Cette hypoplasie est moins marquée à 4 et 6 mois qu'à 1,5 mois suggérant la mise en place d'une compensation (Figure 53, résultats non publiés, Mickael Mathieu). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'activité du complexe PRC2 pourrait être nécessaire au développement de la cortico-surrénale, comme c'est le cas pour d'autres tissus, tels que le cœur (He et al., 2012) ou les os (Schwarz et al., 2014).

Les défauts développementaux induits par l'invalidation ciblée de *Eed* grâce aux régions régulatrices de Sf1 ne permettent pas d'utiliser ces modèles pour étudier l'impact de l'inactivation de *Eed* et potentiellement de *Ezh2* dans le contexte de la tumorigénèse. Afin d'invalider *Eed* et *Ezh2* à des stades pertinents pour la tumorigénèse et de s'affranchir des altérations développementales, nous avons obtenu une Cre inductible par le tamoxifène sous le contrôle des régions régulatrices de *P450Scc* (Cyp11A1) (*Scc:Cre-ERT2*) (don du Dr Amanda Swain). Ces souris seront croisées avec les souris Eed<sup>Fl/Fl</sup> et Ezh2<sup>Fl/Fl</sup>. Les souris résultant de ces croisements pourront alors être croisées avec les souris AdTag. L'induction de la recombinaise Cre par le traitement au tamoxifène permettra alors d'analyser l'impact de l'invalidation de *Eed* et *Ezh2* à des stades pertinents de la tumorigénèse (initiation, progression maligne).





# DEUXIEME PARTIE :

Interaction des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et PKA dans la  
zonation cortico-surrénalienne



# RESULTATS ET DISCUSSION



## ARTICLE 2 :

WNT signalling inhibition by PKA is involved in adrenal zonation and prevents tumour development

Coralie Drelon, Annabel Berthon, Isabelle Sahut-Barnola, Mickaël Mathieu, Typhanie Dumontet, Marie Batisse-Lignier, Igor Tauveron, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Jean-Christophe Pointud, Seppo Vainio, Andreas Schedl, Constantine Stratakis, Antoine Martinez, Pierre Val.

En préparation.



# WNT signalling inhibition by PKA is involved in adrenal zonation and prevents tumour development

Coralie Drelon<sup>1</sup>, Annabel Berthon<sup>1,2</sup>, Isabelle Sahut-Barnola<sup>1</sup>, Mickaël Mathieu<sup>1</sup>, Typhanie Dumontet<sup>1</sup>, Marie Batisse-Lignier<sup>1,3</sup>, Igor Tauveron<sup>1,3</sup>, Anne-Marie Lefrançois-Martinez<sup>1</sup>, Jean-Christophe Pointud<sup>1</sup>, Seppo Vainio<sup>4</sup>, Andreas Schedl<sup>5</sup>, Constantine Stratakis<sup>2</sup>, Antoine Martinez<sup>1</sup> & Pierre Val<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CNRS, UMR 6293, GReD, Inserm U1103, F-63171, Aubière Cedex

<sup>2</sup>Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Md 20892-1103, Bethesda, USA

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, F- 63000, Clermont-Ferrand

<sup>4</sup>Biocenter Oulou, 90220 Oulou, Finland

<sup>5</sup>Inserm UMR1091, CNRS UMR 7277, Institute of Biology Valrose, F-06108, Nice

---

## Abstract

Adrenal cortex function relies on functional zonation, which results in production of aldosterone by outer zona glomerulosa (ZG) and glucocorticoids by inner zona fasciculata (ZF). Adrenal cortex undergoes constant cell renewal, which involves recruitment of capsular/subcapsular progenitors to ZG fate and subsequent lineage conversion to ZF identity. We have previously shown that WNT/ $\beta$ -catenin signalling is involved in ZG differentiation and that its constitutive activation throughout the cortex resulted in ectopic ZG formation at the expense of ZF. This suggested that WNT signalling had to be inactivated in order to allow ZG to ZF lineage conversion. Here we show that Wnt4 is an important driver of WNT pathway activation and subsequent ZG differentiation. Using a combination of hormonal manipulations and genetic models we further show that PKA activation prevents ZG differentiation through Wnt4 repression and subsequent WNT pathway inhibition. This strongly suggests that PKA activation in ZF is a key driver of WNT inhibition and lineage conversion during cortical cell renewal. We further extend these observations to adrenal cortex tumour development by showing that constitutive PKA activation inhibits  $\beta$ -catenin-induced tumorigenesis. Reciprocally, partial inactivation of PKA catalytic activity is associated with a drastic acceleration of aggressive tumour development. Altogether these data show that PKA-mediated WNT signalling inhibition is an essential mechanism for lineage conversion and that it may be an important repressor of WNT-induced tumorigenesis.

---

## Introduction

The adrenal cortex plays essential roles in body homeostasis through secretion of mineralocorticoids, essential for sodium and potassium homeostasis and glucocorticoids, which are involved in stress response, glucose homeostasis and immune suppression. The production of these two distinct steroids is the result of functional adrenal cortex zonation in the perinatal period <sup>1</sup>. This corresponds to the formation of two concentric layers of differentiated cells within mouse adrenal cortex. The outermost zona glomerulosa produces mineralocorticoids in response to Angiotensin II stimulation whereas the innermost zona fasciculata synthesizes glucocorticoids in response to pituitary ACTH. Although the establishment and maintenance of functional zonation is essential for proper adrenal function, the molecular mechanisms involved in these processes remain unclear. Post-natal adrenal cortex undergoes constant cell renewal. Recent lineage tracing studies have shown that adrenal cortex cell progenitors are recruited from capsular/subcapsular reservoirs through Shh/Gli1 signalling <sup>2,3</sup>. These cells migrate centripetally and contribute to both ZG and ZF renewal after differentiation. Interestingly,

lineage-tracing experiments with the regulatory regions of Cyp11b2 have shown that the preferred pathway for adrenal renewal involves initial differentiation to ZG and subsequent lineage conversion to ZF, along centripetal cell migration <sup>3</sup>. This suggests that cells receive positional cues instructing them to sequentially differentiate as ZG and ZF cells along their migration. Spatial restriction of WNT signalling pathway activation plays an essential role in functional liver zonation <sup>4</sup>. In the adrenal cortex, WNT signalling activity is essentially restricted to ZG and we showed that loss of this restriction in genetic models results in ectopic ZG differentiation within ZF <sup>5,6</sup>. *In vivo* and *in vitro*,  $\beta$ -catenin activation is also associated with up-regulation of At1r and Cyp11b2 (ZG identity) and repression of Mc2r and Cyp11b1 (ZF identity) expression <sup>5-7</sup>. These data strongly suggest that WNT/ $\beta$ -catenin is a master driver of ZG identity that has to be inhibited in order to allow lineage conversion from ZG to ZF.

Expression of Mc2r, the receptor for ACTH and Mrap, an accessory protein essential to trigger cAMP/PKA signalling pathway activation is higher in ZF than in ZG <sup>8</sup> and Mc2r has been shown to play an essential role in ZF differentiation <sup>9</sup>. We thus postulated that



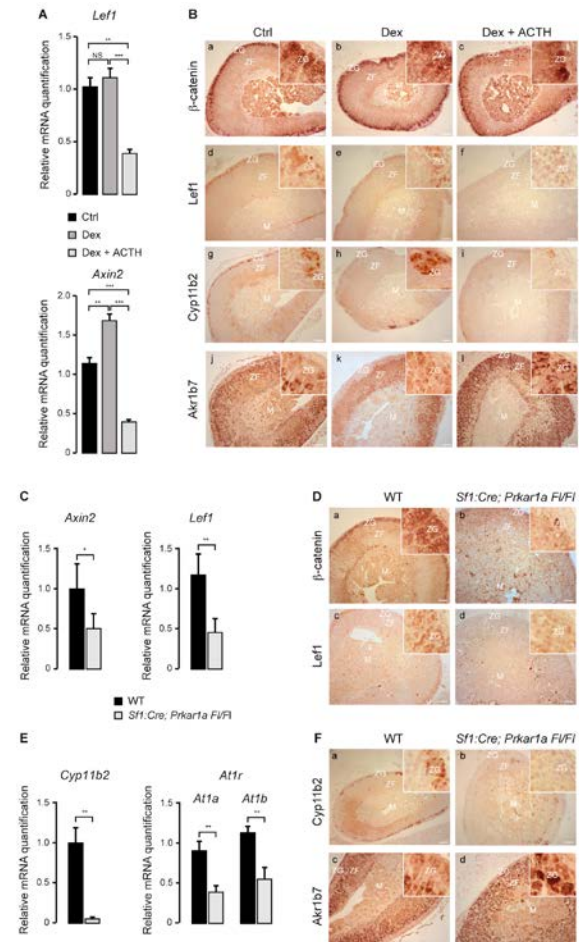


cAMP/PKA signalling played a role in repressing WNT/ $\beta$ -catenin signalling to allow adrenal cortex lineage conversion.

## Results

In order to evaluate a potential role of ACTH/cAMP signalling in repressing WNT/ $\beta$ -catenin pathway, we treated adult wild-type female mice with dexamethasone alone for 5 days or dexamethasone for three days, followed by ACTH for two days. As expected, expression of *Akr1b7* was significantly reduced by dexamethasone and markedly induced by ACTH treatment (Fig S1A). In contrast, RTqPCR analyses showed a significant decrease in the expression of both *Lef1* and *Axin2*, two canonical WNT target genes, in ACTH-treated animals (Fig 1A). Conversely, *Axin2* expression was significantly increased in the animals treated with dexamethasone (Fig 1A). In situ analysis of  $\beta$ -catenin expression showed no major differences between the three treatment groups (Fig 1B, a-c). However, ACTH treatment resulted in a robust reduction of *Lef1* expression, which was almost completely extinguished in the ZG of treated animals (Fig 1B, f vs d). Altogether these data strongly suggested that ACTH treatment could result in inhibition of WNT signalling in the adrenal cortex. We then sought to determine the impact of ACTH on zona glomerulosa differentiation by immuno-histochemistry. This showed decreased *Cyp11b2* expression (Fig 1B, i vs g) and a concomitant expansion of the expression domain of the zona fasciculata marker *Akr1b7* within zona glomerulosa (Fig 1B, l vs j). Altogether, these observations showed that PKA stimulation antagonised WNT signalling within the adrenal cortex, which was correlated with inhibition of ZG and expansion of ZF differentiation in WT adrenals. However, these experiments relied on short-term treatments and were performed on tissues with already established zonation. To further confirm the potential role of PKA-mediated WNT inhibition in the establishment of adrenal cortex zonation, we devised a genetic model of developmental constitutive PKA activation. For this, mice bearing a floxed allele of *Prkar1a*<sup>10</sup> were mated with mice expressing Cre recombinase under the control of *Sf1* regulatory regions, which allows recombination as early as E10.5<sup>11</sup>. Analysis of recombination with the mTmG reporter system<sup>12</sup> confirmed that *Sf1* regulatory regions drove robust recombination throughout the adrenal cortex, including zona glomerulosa as shown by co-expression of *Cyp11b2* and GFP (Fig S1B). RTqPCR analysis of *Prkar1a* mRNA accumulation showed a robust

down-regulation in the adrenals of *Sf1:Cre;Prkar1a* *Fl/Fl* mice compared with controls, which confirmed efficient inactivation of *Prkar1a* (Fig S1C). This was accompanied by up-regulation of *Akr1b7* (Fig S1D) and *StAR* mRNA accumulation and centrifugal expansion

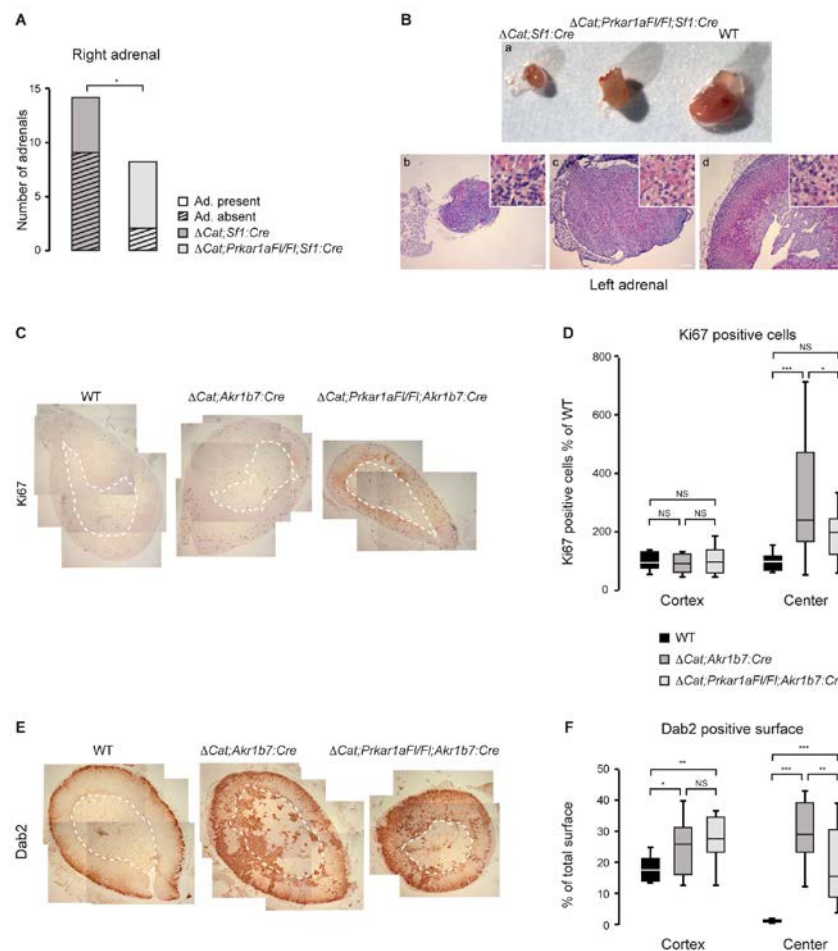


**Figure 1. Antagonistic effects of PKA on WNT signalling and zona glomerulosa differentiation.** A- ACTH treatment inhibits WNT target genes expression in the adrenal gland. Wild-type C57/Bl6 mice were treated for 5 days with vehicle (Ctrl) or Dexamethasone (Dex) or for 3 days with dexamethasone followed by two days of Synacthene retard (Dex + ACTH). *Lef1* and *Axin2* expression levels were then analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from adrenals. Bars represent mean expression in 4 animals per group  $\pm$  SEM. B- WNT pathway and zona glomerulosa differentiation are inhibited by ACTH treatment. Expression of  $\beta$ -catenin, *Lef1* (WNT pathway), *Akr1b7* (zona fasciculata) and *Cyp11b2* (zona glomerulosa) was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from the same animal groups as in A. C- Constitutive activation of PKA signalling inhibits WNT target genes expression in the adrenal gland. *Axin2* and *Lef1* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1a* *Fl/Fl* adrenals. D- Constitutive activation of PKA signalling inhibits  $\beta$ -catenin and *Lef1* accumulation in zona glomerulosa. Expression of  $\beta$ -catenin and *Lef1* was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1a* *Fl/Fl* adrenals. E- Zona glomerulosa differentiation is inhibited by constitutive PKA signalling. *Cyp11b2* and angiotensin II receptor *At1r* isoforms a & b expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1a* *Fl/Fl* adrenals. F- Constitutive PKA signalling promotes zona fasciculata differentiation at the expense of zona glomerulosa. Expression of *Cyp11b2* and *Akr1b7* was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1a* *Fl/Fl* adrenals. In C and E, Bars represent mean expression in 6 animals per group  $\pm$  SEM. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (A) or by Student's *t* test (C,E). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ; NS: Not significant. In all images, insets are focused on zona glomerulosa. Scale bars represent 100  $\mu$ m. ZG, zona glomerulosa; ZF, zona fasciculata; M, medulla.



of foetal-like 20 $\alpha$ HSD-positive cells (Fig S1F-G), which was reminiscent of AdKO mice in which, *Prkar1a* inactivation was driven by *Akr1b7* regulatory regions<sup>13</sup> (These mice will be fully characterised in another report). We then evaluated WNT signalling by RTqPCR. Consistent with the effect of ACTH stimulation, chronic activation of PKA signalling resulted in robust repression of *Axin2* and *Lef1* mRNA accumulation (Fig 1C). This was confirmed by a

regulation of *Cyp11b2* and Angiotensin II receptors *At1a/At1b* expression in *Sf1:Cre;Prkar1a<sup>Fl/Fl</sup>* animals (Fig 1E). This was confirmed in situ by an almost complete extinction of *Cyp11b2* expression (Fig 1F, a-b) and expansion of *Akr1b7* towards the presumptive zona glomerulosa (Fig 1F, c-d), which was consistent with increased *Akr1b7* mRNA accumulation (Fig S1D). We thus concluded that chronic constitutive activation of



**Figure 2. Constitutive PKA signalling counteracts constitutive WNT signalling. A-B Constitutive PKA activation partially rescues WNT-induced developmental phenotypes. A-** Constitutive activation of  $\beta$ -catenin with *Sf1:Cre* driver is associated with right adrenal gland aplasia in 9 out of 14 animals (left bar). Genetic ablation of *Prkar1a* significantly rescues this phenotype (aplasia in 2 out of 8 animals, right bar),  $p=0.0416$  in N-1 two proportion test. **B-** Left adrenal size (a) and histological features are partially restored by genetic ablation of *Prkar1a* in the context of *Sf1:Cre* mediated constitutive activation of  $\beta$ -catenin (c vs. b). Wild-type adrenal is shown in d. **C-D Constitutive PKA activation inhibits WNT-induced proliferation. C-** Ki67 expression was analysed by immunohistochemistry in wild-type, constitutive active  $\beta$ -catenin mutants ( $\Delta Cat; Akr1b7:Cre$ ) and constitutive active  $\beta$ -catenin mutants in the context of *Prkar1a* genetic ablation ( $\Delta Cat; Prkar1a^{Fl/Fl}; Akr1b7:Cre$ ). **D-** Ki67 positive cells were separately counted in the adrenal cortex and central adrenal region of 12-14 animals of each genotype. Numbers of positive cells are represented as a percentage of positive cells in each wild-type compartment. **E-F Constitutive PKA activation inhibits WNT-induced ectopic zona glomerulosa differentiation. E-** Expression of the zona glomerulosa marker Dab2 was analysed by immunohistochemistry in the same genotypes as in C. **F-** Dab2 stained areas were measured separately in the adrenal cortex and central adrenal region of 10-15 animals of each genotype. Stained areas are expressed as a percentage of total adrenal surfaces. Statistical analyses in D and F were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.005$ ; \*\*\*  $p<0.0005$ ; NS: Not significant. Scale bars represent 100  $\mu$ m. Dashed lines delimit cortex from central adrenal area (medulla and ectopic glomerulosa cells).

marked decrease in  $\beta$ -catenin and *Lef1* protein expression in the outer cortex of *Sf1:Cre;Prkar1a<sup>Fl/Fl</sup>* mice compared with wild-type mice (Fig 1D, a-d). Consistent with the hypothesis that PKA-mediated WNT inhibition resulted in deficient zona glomerulosa differentiation, RTqPCR showed a marked down-

PKA throughout the adrenal cortex resulted in robust WNT signalling repression and expansion of zona fasciculata at the expense of zona glomerulosa.

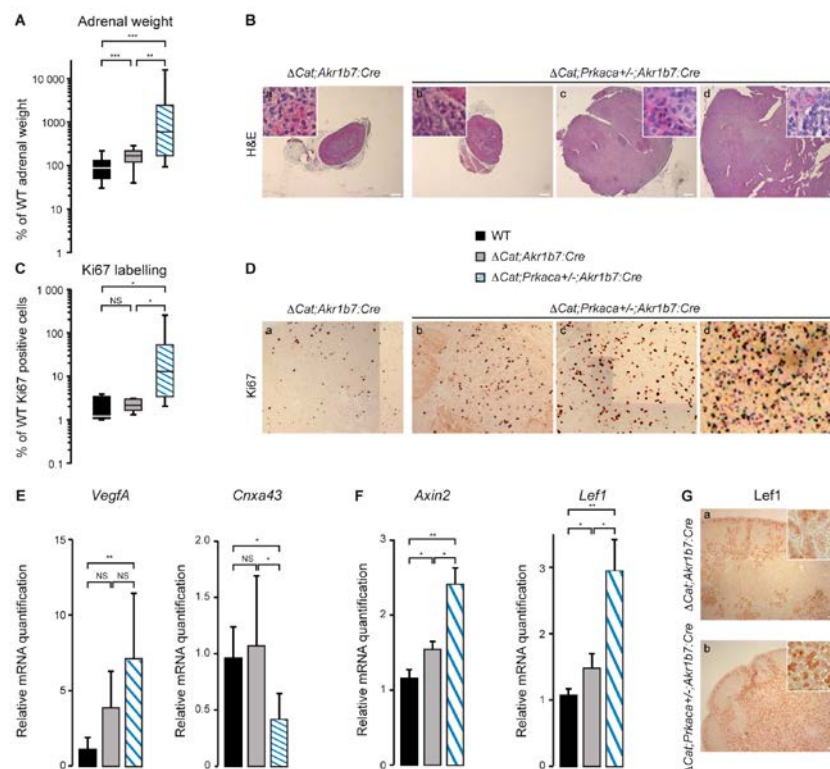
We then wanted to evaluate the capacity of constitutive PKA signalling to inhibit WNT-



induced ectopic ZG differentiation and proliferation. For this, we initially mated mice with *Sf1:Cre*-mediated *Prkar1a* inactivation with *Ctnnb1<sup>Fl(ex3)</sup>* mice<sup>14</sup> (to generate  $\Delta\text{Cat};\text{Sf1:Cre}$  mice). However, consistent with previously published data<sup>15</sup>, the robust activation of WNT signalling triggered by *Sf1*-driven *Cre* expression resulted in left adrenal hypoplasia and in most cases right adrenal agenesis in  $\Delta\text{Cat};\text{Sf1:Cre}$  mice at one month of age, which precluded analysis of adrenal differentiation and proliferation (Fig 2A and 2B, a). However, in this context, genetic ablation of *Prkar1a* allowed partial rescue of the WNT-induced developmental phenotype. This manifested as recovery of an hypoplastic right adrenal in most mice (Fig 2A) and an increase in overall adrenal size (Fig 2B, a), even though adrenal cortex histology was still markedly disrupted in both  $\Delta\text{Cat};\text{Sf1:Cre}$  and  $\Delta\text{Cat};\text{Prkar1a}^{\text{Fl/Fl}};\text{Sf1:Cre}$  mice (Fig 2B, b-d). We thus resorted to using our previously characterised *Akr1b7:Cre* line, in which the later and stochastic expression of *Cre* recombinase bypasses  $\beta$ -catenin-dependent developmental phenotypes (Fig S1H). At 6 months, the adrenal phenotype in  $\Delta\text{Cat}$  mice was characterised by increased proliferation of steroidogenic cells within the central adrenal region (Fig 2C-D and

5). This was associated with aberrant differentiation of *Dab2* positive zona glomerulosa cells within zona fasciculata and central adrenal region (Fig 2E-F). Interestingly, ablation of *Prkar1a* resulted in a decrease in both proliferation and aberrant differentiation of zona glomerulosa cells within the central adrenal region (Fig 2D and F). This suggested that constitutive PKA activation could inhibit WNT-induced hyperproliferation and ectopic ZG differentiation.

To further confirm the repressive action of PKA on WNT signalling, we decided to reduce catalytic PKA activity in order to assess a potential overactivation of WNT signalling. *Prkaca*<sup>+/−</sup> adrenals were indistinguishable from wild-type (data not shown), suggesting normal control of WNT signalling in this genetic context. However, combination of heterozygous *Prkaca* ablation with constitutive  $\beta$ -catenin activation resulted in a marked aggravation of WNT-induced phenotypes. Indeed, adrenal weight was markedly increased in 6 month-old  $\Delta\text{Cat};\text{Prkaca}^{+/−};\text{Akr1b7:Cre}$  mice compared with their  $\Delta\text{Cat};\text{Akr1b7:Cre}$  littermates (Fig 3A). This was correlated with a more dysplastic histology (Fig 3B, b-d vs a) and a significant increase in



**Figure 3. *Prkaca* heterozygosity accelerates WNT-induced tumorigenesis.** **A-** Adrenal weight is significantly increased by loss of one *Prkaca* allele. Adrenal glands from wild-type,  $\Delta\text{Cat};\text{Akr1b7:Cre}$  and  $\Delta\text{Cat};\text{Prkaca}^{+/−};\text{Akr1b7:Cre}$  mice were weighed at sacrifice. **B-** *Prkaca* heterozygosity accelerates WNT-induced hyperplasia and dysplasia.  $\Delta\text{Cat};\text{Akr1b7:Cre}$  (a) and  $\Delta\text{Cat};\text{Prkaca}^{+/−};\text{Akr1b7:Cre}$  (b-d) adrenals were sectioned and counterstained with haematoxylin and eosin. Pictures in b-d show three different adrenals representing the range of phenotypes resulting from *Prkaca* heterozygosity. Scale bar is 400  $\mu\text{m}$ . **C-D-** *Prkaca* heterozygosity increases proliferation. Ki67 expression was analysed by immunohistochemistry in the same genotypes as in A (D). Ki67 positive cells were counted in five high power fields per adrenal (WT, n=3;  $\Delta\text{Cat};\text{Akr1b7:Cre}$ , n=4;  $\Delta\text{Cat};\text{Prkaca}^{+/−};\text{Akr1b7:Cre}$ , n=9). Results are expressed as a labelling index, i.e. as the percentage of Ki67 positive nuclei over the total number of nuclei per field. Pictures in D show representative high power fields for one  $\Delta\text{Cat};\text{Akr1b7:Cre}$  adrenal (a) and three different  $\Delta\text{Cat};\text{Prkaca}^{+/−};\text{Akr1b7:Cre}$  adrenals (b-d). **E-** *Prkaca* heterozygosity is associated with increased malignancy. *VegfA* and *Cnxa43* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from wild-type (n=5),  $\Delta\text{Cat};\text{Akr1b7:Cre}$  (n=7) and  $\Delta\text{Cat};\text{Prkaca}^{+/−};\text{Akr1b7:Cre}$  (n=12) adrenals. **F-G-** *Prkaca* heterozygosity increases WNT pathway activity. **F-** *Axin2* and *Lef1* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from the same animals as above. **G-** *Lef1* expression was analysed by immunohistochemistry in  $\Delta\text{Cat};\text{Akr1b7:Cre}$  and  $\Delta\text{Cat};\text{Prkaca}^{+/−};\text{Akr1b7:Cre}$  adrenals. Insets are centered on ectopic accumulation of *Lef1* within zona fasciculata. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ . Boxplots in A & C cover from 25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentile. Whiskers extend from minimal to maximal values. Bars within boxes show median values. Bars in E & F represent mean expression  $\pm$  SEM. All statistical analyses were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc \* p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.0005; NS: Not significant.

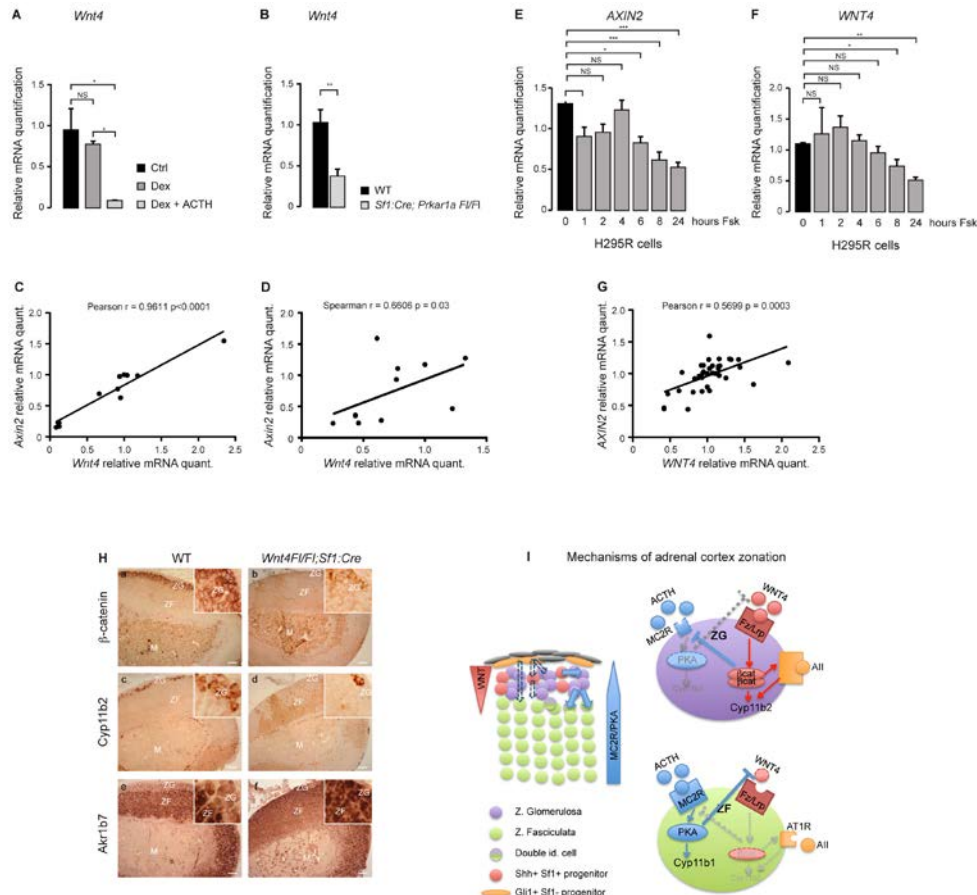




Ki67 labelling index (Fig 3C and D). Acceleration of tumour development in response to *Prkaca* heterozygous ablation was further confirmed by a significant increase in *VegfA* and a decrease in *Connexin43* expression, two hallmarks of adrenal malignancy (Fig 3E). The correlation between decreased PKA activity and increased WNT signalling, was shown by a significant increase in *Axin2* and *Lef1* mRNA accumulation

both *in vitro* and *in vivo*<sup>16,17</sup>. We thus sought to identify the molecular underpinnings of this unexpected inhibition.

WNT ligands exert a central role in the control of WNT/ $\beta$ -catenin pathway activity. Although WNT ligands that induce  $\beta$ -catenin accumulation in zona glomerulosa have not been formally identified, *Wnt4* is expressed in the outer



**Figure 4. WNT4 repression mediates the effect of PKA on WNT signalling in the adrenal gland. A- ACTH stimulation represses *Wnt4* expression.** *Wnt4* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from adrenals of wild-type mice treated with vehicle, dexamethasone or dexamethasone and ACTH as in Figure 1A. Bars represent the mean expression in 4 animals per group  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. **B- Constitutive activation of PKA signalling inhibits *Wnt4* expression.** *Wnt4* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from wild-type and *S1:Cre;Prkar1aF/FI* adrenals. Bars represent the mean expression in 6 animals per group  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by Student's *t* test. **C-D *Axin2* and *Wnt4* expression levels are correlated *in vivo*.** *Axin2* and *Wnt4* expression levels were correlated on the basis of RTqPCR data generated from all animals in A & B. **E-F- Forskolin represses *AXIN2* and *WNT4* expression in human adrenocortical H295R cells.** Human H295R cells were treated with either vehicle (0) or Forskolin  $10^{-5}$ M (Fsk) for 1 to 24 h and *Axin2* expression was analysed by RTqPCR. Bars represent mean expression in at least three independent experiments (in triplicate)  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. **G- *AXIN2* and *WNT4* expression levels are correlated in H295R cells.** *AXIN2* and *WNT4* expression levels were correlated on the basis of RTqPCR data generated from all cell treatments in E&F. **H- *Wnt4* genetic ablation mimics constitutive activation of PKA.** Expression of  $\beta$ -catenin, Cyp11b2 (zona glomerulosa) and Akr1b7 (zona fasciculata) was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from wild-type and *Wnt4F/FI;S1:Cre* mice. **I- Model for adrenocortical zonal differentiation.** \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ; NS: Not significant.

in  $\Delta Cat;Prkaca+/-;Akr1b7:Cre$  mice, compared with  $\Delta Cat;Akr1b7:Cre$  mice (Fig 3F). This was further confirmed by a marked increase in the number of Lef1-labelled cells in immunohistochemistry (Fig 3G, b vs a).

Altogether, these experiments showed that PKA activation inhibited WNT signalling in the context of adrenal zonation, development and WNT-induced tumourigenesis. This was in sharp contrast with previous publications showing that PKA could stimulate WNT/ $\beta$ -catenin activity

adrenal cortex and *Wnt4* knockout mice have decreased Cyp11b2 expression and plasma aldosterone concentrations at birth<sup>18</sup>. Conversely, *WNT4* overexpression in human adrenocortical cell lines induces CYP11B2 expression and aldosterone production<sup>19</sup>. This suggests that *WNT4* may be one of the drivers of WNT pathway activation in the adrenal cortex and subsequent ZG differentiation. Interestingly, RTqPCR analysis of *Wnt4* expression showed a marked inhibition in response to ACTH treatment in wild-type mice (Fig 4A) and in mice





with genetic ablation of *Prkar1a* (Fig 4B). This suggested that decreased *Wnt4* expression could account for decreased WNT signalling in response to PKA stimulation. Consistent with this idea there was a significant correlation between *Wnt4* and *Axin2* expression levels in both models (Fig 4 C-D). In order to rule out a possible reduction in the number of *Wnt4* expressing cells in animal models in response to PKA stimulation, we evaluated the effect of PKA activation on WNT signalling in H295R human adrenocortical cell lines treated with forskolin. As expected, this treatment induced rapid accumulation of *StAR* mRNAs (Fig S2). As in mouse models, *AXIN2* mRNA accumulation was significantly inhibited after 8h of Forskolin treatment (Fig 4E). This was accompanied by concomitant inhibition of *WNT4* mRNA accumulation (Fig 4F). Expression levels of *AXIN2* and *WNT4* were also significantly correlated in this cell line (Fig 4G).

Altogether, these experiments suggested that *Wnt4* played an important role in Wnt pathway stimulation in the adrenal cortex and that inhibition of its expression by PKA could be involved in PKA-mediated WNT signalling repression. To further confirm these hypotheses we generated a mouse model of *Wnt4* inactivation in the adrenal cortex by mating *Wnt4<sup>Fl/Fl</sup>* mice<sup>20</sup> with *Sf1:Cre* mice. Interestingly, mice with *Wnt4* inactivation had markedly reduced  $\beta$ -catenin accumulation in zona glomerulosa (Fig 4H, b vs a). This demonstrated that *Wnt4* was involved in WNT pathway activation in the adrenal cortex. Consistent with the essential role of  $\beta$ -catenin in ZG differentiation, there was a marked reduction in the number of Cyp11b2 positive cells in response to *Wnt4* inactivation (Fig 4H d vs c). This was further associated with expansion of ZF differentiation as shown by strong *Akr1b7* expression within the presumptive ZG of mutant adrenals (Fig 4H, f vs e). Thus, *Wnt4* inactivation phenocopied the effect of constitutive PKA activation, resulting from genetic ablation of *Prkar1a* (compare Fig 4H with Fig 1D&F). We concluded that *Wnt4* was an essential driver of ZG differentiation through WNT pathway activation and that *Wnt4* repression was, at least in part, responsible for WNT pathway inhibition in response to PKA activation.

## Discussion

### Mechanisms of adrenal zonation

Adrenal cortex renewal after recruitment of sub-capsular progenitors preferentially occurs through lineage conversion from ZG to ZF cell

identity<sup>3</sup>. Establishment of ZG cell identity is largely dependent on activation of WNT signalling in the outer cortex, which also prevents ZF differentiation<sup>5-7</sup>. However, the molecular mechanisms involved in WNT repression and subsequent conversion of ZG cells to ZF identity were unknown. Here we show that WNT pathway activation in ZG is dependent on *Wnt4* expression. We further show that either ACTH treatment or genetic constitutive PKA activation resulting from *R1 $\alpha$*  ablation throughout the adrenal cortex not only inhibits canonical WNT signalling and subsequent glomerulosa differentiation by repressing *Wnt4* expression, but also allows ZF expansion in the presumptive ZG area. This strongly suggests that PKA activation within inner cortex is essential to restrict WNT pathway activity, inhibit subsequent ZG differentiation and allow acquisition of ZF identity. Altogether, these observations suggest the following integrated model for functional adrenal cortex zonation (Fig 5): Within outer cortex, progenitor cells engage in glomerulosa differentiation in response to active WNT signalling, which stimulates expression of angiotensin II receptor *At1r* and of *Cyp11b2*<sup>6</sup>. Activation of  $\beta$ -catenin also ensures inhibition of ZF differentiation through repression of *Mc2r* and *Cyp11b1* expression, which maintains cells in their ZG phenotype (this paper and<sup>5-7</sup>). Along their centripetal migration, cells with ZG identity progressively escape from active WNT signalling influence, which results in decreased  $\beta$ -catenin activation and extinction of *Lef1* expression as they reach ZF (this paper). WNT-mediated inhibition of *Mc2r* expression<sup>7</sup> is released, which allows for activation of PKA signalling by ACTH. This in turn definitively inhibits WNT signalling (this paper), which allows for acquisition of fasciculata identity. In this model, rather than an abrupt transition from ZG to ZF identity, cells at the boundary of ZG and ZF would transiently display features of both differentiation programs. The observation of cells with expression of both *Cyp11b1* and *Cyp11b2* in the inner glomerulosa is consistent with this hypothesis<sup>3</sup>. This suggests that adrenal cortex zonation results from a subtle equilibrium between WNT and PKA signalling pathways.

One apparent contradiction to our model is the lack of ZG expansion in *Mc2r* knockout mice<sup>9</sup> that would be predicted to result from derepression of  $\beta$ -catenin activity within zona fasciculata. However, one likely explanation is that absence of PKA signalling within the cortex of *Mc2r* knockout mice blocks cortical cell



renewal, which would prevent centripetal displacement of ZG cells within the cortex. This would then artificially maintain a relatively normal ZG/ZF boundary, even in the absence of Mc2r expression. Consistent with this hypothesis, dexamethasone treatment for 2 weeks was shown to inhibit lineage conversion from ZG to ZF<sup>3</sup>. Another non-mutually exclusive hypothesis is that the restricted domain of Wnt4 expression and activity is roughly preserved even in the absence of PKA signalling, which would ensure maintenance of zonation in cases of HPA axis depression. In this scenario, PKA-mediated Wnt4 repression would just work as a secondary lock mechanism to ensure normal cortex zonation in a physiological context. This will have to be carefully examined once a conditional *Prkaca* allele becomes available.

Our observations raise the question of adrenal cell plasticity. We show that glomerulosa identity can be converted to fasciculata upon supra-physiological ACTH stimulation. This suggests that the low levels of Mc2r and Mrap expression in mouse ZG are sufficient to induce inhibition of WNT signalling and conversion to ZF phenotype under these particular conditions. However, whether fasciculata represents a terminal differentiation status is unclear. In rats, sodium restriction for 3 to 10 days results in increased aldosterone production and increased Cyp11b2 expression<sup>21,22</sup>. However, even though Cyp11b2 staining extends within outer cortex, there is no intermingling of ZG and ZF cells<sup>22</sup>. This suggests that once cells have turned on fasciculata differentiation programme, they cannot revert to glomerulosa differentiation, even under supra-physiological demand. However, this has to be taken with caution. Indeed, in rats ZG and ZF are physically separated by a large undifferentiated zone<sup>21</sup>, which is not found in mouse or human.

Functional adrenal cortex zonation is first established around birth and maintained throughout life<sup>23</sup>. Our observation of similar effects with ACTH treatment of adult adrenals or constitutive activation of PKA starting from E10.5 suggests that our model of PKA-mediated WNT inhibition applies both to establishment and maintenance of adrenal zonation. However, confirmation of this hypothesis would require the use of an inducible steroidogenic Cre driver (*e.g.* *Sf1:Cre-ERT2*) which is currently unavailable.

#### **PKA mediated WNT inhibition and tumourigenesis**

In the adrenal,  $\beta$ -catenin activation is associated with both benign and malignant tumorigenesis. In contrast, abnormal PKA signalling has only been described in benign tumours. Observation of abnormal  $\beta$ -catenin accumulation within a number of benign tumours associated with PKA pathway activation suggested that some of the oncogenic effects of PKA could be mediated by WNT pathway activation<sup>23-27</sup>. Our data clearly shows that this is an unlikely scenario: 1) there is clear inhibition of WNT pathway activity and  $\beta$ -catenin accumulation in our mouse model of *Sf1:Cre* mediated *Prkar1a* inactivation. This inhibition can even partially rescue deleterious WNT-induced developmental phenotypes 2) Combination of PKA activation (through *Prkar1a* inactivation) with WNT pathway activation mediated by the *Akr1b7:Cre* driver, partially inhibits WNT-induced tumourigenesis 3) Inactivation of one allele of the catalytic subunit of PKA markedly accelerates WNT-induced tumourigenesis. Although we cannot completely rule out that species-specific mechanisms may account for these effects, it is more likely that the kinetics of pathway alterations play an essential role in phenotypic outcome. Indeed, in most PKA-dependent tumours that were analysed, PKA activation resulted from germline mutations of *PRKARIA* or *GNAS*. Although  $\beta$ -catenin was found activated in these tumours on the basis of immunohistochemical analyses, *CTNNB1* somatic mutations were mostly found in larger tumours or macronodules that developed in the context of micronodular lesions<sup>24,26</sup>. Thus in patients, the sequence of events starts with PKA activation, followed by  $\beta$ -catenin activation in the most aggressive tumours. This is in sharp contrast with our mouse models in which both alterations are triggered at the same time by Cre recombinase expression. It is thus tempting to speculate that those tumours that combine both alterations in patients have overcome the negative effect of PKA on  $\beta$ -catenin activity, presumably through mutations in some essential components of this inhibitory mechanism, which would result in a selective growth advantage.

The marked acceleration in WNT-induced tumourigenesis in response to *Prkaca* heterozygosity is intriguing. Indeed, mice combining both alterations develop tumours with malignant characteristics as early as 6 months. This is in striking contrast with the 16 to 19 months period required for  $\beta$ -catenin activation alone, to induce a similar phenotype with the same Cre driver<sup>5,29</sup>. It suggests that a decrease in PKA activity could favour acquisition of malignant characteristics in tumours with



WNT pathway activation in patients. Interestingly LOH at the ACTH receptor was associated with more aggressive adrenal cortex carcinoma (ACC) in a small cohort of patients<sup>30</sup>. Retrospective analysis of available transcriptome data also showed down-regulation of *MC2R* and *MRAP* expression in ACC compared with normal adrenal and adenomas (Fig S3). It is also interesting to note that within a large retrospective cohort, patients with cortisol-producing carcinomas have a poorer prognosis than patients with non-secreting or androgen-secreting tumours<sup>31</sup>. One may speculate that the increased feedback on the HPA axis in these patients may reduce PKA activation, which could favour WNT signalling pathway activation. Indeed, analysis of the transcriptome data from a cohort of patients from University of Michigan<sup>32</sup> shows decreased *StAR* expression and a concomitant increase in *LEF1* and *AXIN2* transcript levels in cortisol-producing ACC in comparison with ACC with other secretory profiles (Fig S3). Although this hypothesis will require thorough analysis of larger cohorts, it suggests that PKA activation may oppose WNT-induced malignant tumourigenesis in patients.

### Mechanisms of WNT inhibition by PKA

Our *in vivo* and *in vitro* data clearly demonstrate an inhibitory action of PKA activation on WNT/ $\beta$ -catenin signalling within the adrenal cortex. This is in sharp contrast with data from the literature showing that PKA can stimulate WNT pathway activity either by phosphorylating and inactivating GSK3 $\beta$ <sup>33</sup> or by directly phosphorylating  $\beta$ -catenin on serines 552 and 675<sup>16,17</sup>. This in turn would either stabilise  $\beta$ -catenin<sup>17</sup> and/or increase coactivator recruitment<sup>16</sup>, depending on the study. These *in vitro* findings are supported by *in vivo* data showing that PKA can stabilise/activate  $\beta$ -catenin, which is involved in hematopoietic stem cells homeostasis regulation, liver regeneration<sup>34</sup>, proliferation<sup>35</sup> and fibrosis<sup>36</sup>, as well as intestinal tumourigenesis<sup>37,38</sup>.

Our genetic and hormonal manipulation data show that Wnt4 repression by PKA is one of the mechanisms involved in WNT/ $\beta$ -catenin repression within the adrenal cortex. How decreased WNT ligand expression would override intracellular activation of WNT signalling is unclear. However, in contrast with COS7 cells in which *AXIN2* expression is stimulated by forskolin, H295R cells show a combination of activating (serines 552 & 675) and inactivating phosphorylations (serines 33,

37, 45 and threonine 41) in response to forskolin stimulation (Fig S4). This is in agreement with decreased WNT ligand stimulation and suggests that in adrenocortical cells the combination of activating and inactivating phosphorylations tips the balance towards inactivation of the pathway.

One conundrum of our study is the preservation of PKA-mediated WNT inhibition in the context of destruction complex resistant  $\beta$ -catenin (H295R cells<sup>39</sup> and  $\Delta$ Cat mice). In this setting, decreased Wnt4 expression is unlikely to account for repression of the constitutively activated pathway, although there is increasing evidence that cells with activated  $\beta$ -catenin retain some sensitivity to extra-cellular signals such as RSPO2 and SFRPs<sup>40,41</sup>. We previously showed that SFRP2 could be involved in WNT signalling repression in the adrenal gland<sup>6</sup>. However, RTqPCR analysis of the expression of SFRP2 and other family members showed marked down-regulation in the adrenals of ACTH treated mice (Fig S5). This suggests that SFRPs are not involved in PKA-mediated WNT signalling repression in this context. Further studies are thus required to identify novel crosstalks between PKA and  $\beta$ -catenin within the adrenal cortex.

In conclusion, we have identified PKA-mediated WNT inactivation as an essential mechanism for lineage conversion from ZG to ZF. Our genetic data further show that this novel mechanism is also a potentially important repressor of WNT-induced tumourigenesis.

---

### Acknowledgements

We wish to thank Khirredine Ouchen, Sandrine Plantade and Philippe Mazuel for animal care, Jean-Paul Saru for western blot analyses and Christelle Damon-Soubeyrand for management of histological analyses facilities (Anipath Clermont). This work was funded through institutional support from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne and through grants from Fondation de France, La Ligue Contre le Cancer (Allier & Puy de Dôme committees) and Société Française d'Endocrinologie (young researcher grant to C.D.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.



## Materials and Methods

### Mice

All animal studies were approved by Auvergne Ethics committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare. *Akr1b7:Cre*<sup>42</sup>, *Sf1:Cre*<sup>11</sup>, *mT/mG*<sup>12</sup>, *Ctnnb1Fl(ex3)*<sup>14</sup>, *Prkar1aFl/Fl*<sup>10</sup>, *Prkaca*<sup>+/-</sup><sup>43</sup>, *Wnt4Fl/Fl*<sup>20</sup> mice were all previously described. They were all maintained and bred on a mixed background. Throughout the manuscript,  $\Delta$ Cat refers to either heterozygous *Ctnnb1Fl(ex3)/+* or homozygous *Ctnnb1Fl(ex3)/+* mice. We did not observe any discernible difference between both genotypes, which is consistent with the dominant effect of the mutation<sup>14</sup>. Littermate control animals were used in all experiments. For hormonal manipulations, C57/Bl6 mice were injected subcutaneously with vehicle for 5 days (sesame oil twice daily), dexamethasone acetate for 5 days (75  $\mu$ g twice daily in sesame oil) or dexamethasone acetate for 3 days and Synacthene Retard for 2 days (1.2U, Sigma Tau Laboratories). At the end of experimental procedures, mice were euthanized by decapitation and blood was collected on vacuum blood collection tubes (VF-053STK, Terumo). Adrenals were either frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% PFA. Total mRNAs were extracted using RNeasy nucleotide extraction kit (Macherey Nagel) according to manufacturer's instructions.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry for  $\beta$ -catenin, Dab2, Cyp11b2, *Akr1b7*, Ki67 and 20 $\alpha$ HSD was performed on tissues embedded in paraffin as previously described<sup>5,13,29</sup>. For Lef1 immunodetection, slides were treated for 20 min in boiling sodium citrate 10 mM, tween 0.05% and blocked with 1% BSA. They were then incubated overnight with Lef1 antibody (1/100, #04-1159, Millipore) in 0.1% BSA. All of the above primary antibodies were detected with SignalStain Boost HRP-Polymer solution (#8114S or #8125P, Cell Signaling). For GFP immunodetection, slides were treated for 20 min in boiling Vector Unmasking Solution (H3300, Vector Labs) and blocked with 10% foetal bovine serum (FBS) and 3% BSA. They were then incubated overnight with GFP antibody (1/200, Ab5450, Abcam) in FBS 1%, BSA 1%. Primary antibody was detected with anti-goat Alexa 488 antibody (1/1000, A11055, Molecular Probes Invitrogen). All immunohistochemical analyses were conducted on an automated processor (Intavis InSitu Pro) to ensure homogeneity and reproducibility of detections. Images were acquired with a Zeiss Axioplan 2

microscope and Axiocam HR camera. They were minimally processed for global levels and white balance using Adobe Photoshop®.

### Reverse Transcription quantitative PCR

One microgram of total mRNAs (from tissues or cell culture) was reverse transcribed for 1 hour at 37°C with 5 pmoles of random hexamers primers, 200 units reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 units RNasin (N2615, Promega). One microliter of a one-tenth dilution of cDNA was used in each quantitative PCR. Except for *VegfA* and *Connexin43* that were amplified with Taqman chemistry as described in<sup>29</sup>, all other reactions were conducted with SYBR qPCR Premix Ex Taq II Tli RNase H+ (TAKRR820W, Takara). Primer pairs are listed in table S1. For each experiment and primer pairs, efficiency of PCR reactions was evaluated by amplification of serial dilutions of a mix of cDNAs. Relative gene expression was obtained by the  $\Delta\Delta C_t$  method after normalisation to *36b4* (mouse) or *PPIB* (human).

### Cell culture

Human adrenocortical cancer H295R cell line was grown with DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (S1800-500, Biowest), 2mM L-Glutamine (25030, Gibco), 50 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin and 1X Insulin Transferrin Selenium (41400-045, Gibco). COS7 cell line was grown with DMEM supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (S1800-500, Biowest), 2mM L-Glutamine (25030, Gibco), 50 U/ml Penicillin and 100  $\mu$ g/ml Streptomycin. For PKA stimulation treatments, cells were seeded at a density of  $3.10^5$  cells per well in 6 wells-plates. The day after seeding, cells were deprived of serum and growth factors for 24h. They were then treated with vehicle (DMSO) or with forskolin ( $10^{-5}$ M) for the indicated amount of time. Proteins were extracted with RIPA buffer in the presence of protease (Complete 1X, Roche) and phosphatase inhibitors (NaF, 1mM; Na3VO4, 1mM). mRNAs were extracted by TriReagent (Molecular Research Center Inc.) according to manufacturer's instructions. All experiments were performed at least three times in triplicate.

### Western Blot

Fifteen to forty micrograms of total proteins were loaded on an 8% SDS-PAGE gel, transferred onto nitrocellulose and detected with the following antibodies: total  $\beta$ -catenin 1/1000 (610153, BD Biosciences Pharmingen), pS552- $\beta$ -





catenin (#5651, Cell Signaling), pS675- $\beta$ -catenin (#4176, Cell Signaling), pT41/S45- $\beta$ -catenin (#9565, Cell Signaling), pS33/S37/T41- $\beta$ -catenin (#9561, Cell Signaling). Signals were acquired with a DNR MF ChemiBis 3.2 camera and Multi Gauge software suite (Fujifilm).

## References

- Kim, A. C. *et al.* In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev* **30**, 241–63 (2009).
- King, P., Paul, A. & Laufer, E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21185–21190 (2009).
- Freedman, B. D. *et al.* Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev. Cell* **26**, 666–673 (2013).
- Benhamouche, S. *et al.* Apc tumor suppressor gene is the 'zonation-keeper' of mouse liver. *Dev Cell* **10**, 759–70 (2006).
- Berthon, A. *et al.* Constitutive  $\beta$ -catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* **19**, 1561–1576 (2010).
- Berthon, A. *et al.* WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 889–905 (2014).
- Walczak, E. M. *et al.* Wnt-Signaling Inhibits Adrenal Steroidogenesis by Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **2014**1060 (2014). doi:10.1210/me.2014-1060
- Gorrigan, R. J., Guasti, L., King, P., Clark, A. J. & Chan, L. F. Localisation of the melanocortin-2-receptor and its accessory proteins in the developing and adult adrenal gland. *J. Mol. Endocrinol.* **46**, 227–232 (2011).
- Chida, D. *et al.* Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18205–18210 (2007).
- Kirschner, L. S. *et al.* A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res.* **65**, 4506–4514 (2005).
- Bingham, N. C., Verma-Kurvari, S., Parada, L. F. & Parker, K. L. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* **44**, 419–24 (2006).
- Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genes. N. Y. N* **2000** **45**, 593–605 (2007).
- Sahut-Barnola, I. *et al.* Cushing's syndrome and foetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. *PLoS Genet* **6**, e1000980 (2010).
- Harada, N. *et al.* Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo J* **18**, 5931–42 (1999).
- Huang, C.-C. J., Liu, C. & Yao, H. H.-C. Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **361**, 165–171 (2012).
- Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D. & Dulin, N. O. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **281**, 9971–6 (2006).
- Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I. & Kikuchi, A. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* **25**, 9063–72 (2005).
- Heikkilä, M. *et al.* Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* **143**, 4358–4365 (2002).
- Chen, M. & Hornsby, P. J. Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. *Horm Metab Res* **38**, 549–55 (2006).
- Shan, J., Jokela, T., Peltoketo, H. & Vainio, S. Generation of an allele to inactivate Wnt4 gene function conditionally in the mouse. *Genes. N. Y. N* **2000** **47**, 782–788 (2009).
- Mitani, F. *et al.* A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology* **135**, 431–438 (1994).
- Nishimoto, K., Harris, R. B. S., Rainey, W. E. & Seki, T. Sodium deficiency regulates rat adrenal zona glomerulosa gene expression. *Endocrinology* **155**, 1363–1372 (2014).
- Yates, R. *et al.* Adrenocortical development, maintenance, and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **106**, 239–312 (2013).
- Tadjine, M. *et al.* Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Clin Endocrinol Oxf* **69**, 367–373 (2008).
- Almeida, M. Q. *et al.* Activation of cyclic AMP signaling leads to different pathway alterations in lesions of the adrenal cortex caused by germline PRKAR1A defects versus those due to somatic GNAS mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E687–693 (2012).
- Gaujoux, S. *et al.* Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4135–40 (2008).
- Azevedo, M. F. & Stratakis, C. A. The transcriptome that mediates increased cAMP signaling in PRKAR1A defects and other settings. *Endocr. Pr.* **1**–19 (2011). doi:7676QPTL4HJ12766 [pii] 10.4158/EP10412.RA
- Horvath, A. *et al.* Serial analysis of gene expression in adrenocortical hyperplasia caused by a germline PRKAR1A mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 584–96 (2006).
- Drelon, C. *et al.* Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS One* **7**, e44171 (2012).
- Reincke, M. *et al.* Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3054–3058 (1997).
- Else, T. *et al.* Adjuvant therapies and patient and tumor characteristics associated with survival of adult patients with adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 455–461 (2014).
- Giordano, T. J. *et al.* Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* **162**, 521–531 (2003).
- Fang, X. *et al.* Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11960–5 (2000).
- Goessling, W. *et al.* Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* **136**, 1136–1147 (2009).
- Fanti, M., Singh, S., Ledda-Columbano, G. M., Columbano, A. & Monga, S. P. Tri-iodothyronine induces hepatocyte proliferation by protein kinase A-dependent  $\beta$ -catenin activation in rodents. *Hepatology. Baltim. Md* **59**, 2309–2320 (2014).
- Spirli, C. *et al.* Protein kinase A-dependent pSer(675) - $\beta$ -catenin, a novel signaling defect in a mouse model of congenital hepatic fibrosis. *Hepatology. Baltim. Md* **58**, 1713–1723 (2013).
- Van Veelen, W. *et al.*  $\beta$ -catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* **60**, 1204–1212 (2011).
- Brudvik, K. W., Paulsen, J. E., Aandahl, E. M., Roald, B. & Taskén, K. Protein kinase A antagonist inhibits  $\beta$ -catenin nuclear translocation, c-Myc and COX-2 expression and tumor promotion in Apc(Min/+) mice. *Mol. Cancer* **10**, 149 (2011).
- Tissier, F. *et al.* Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* **65**, 7622–7 (2005).
- Wu, C. *et al.* RSP02-LGR5 signaling has tumour-



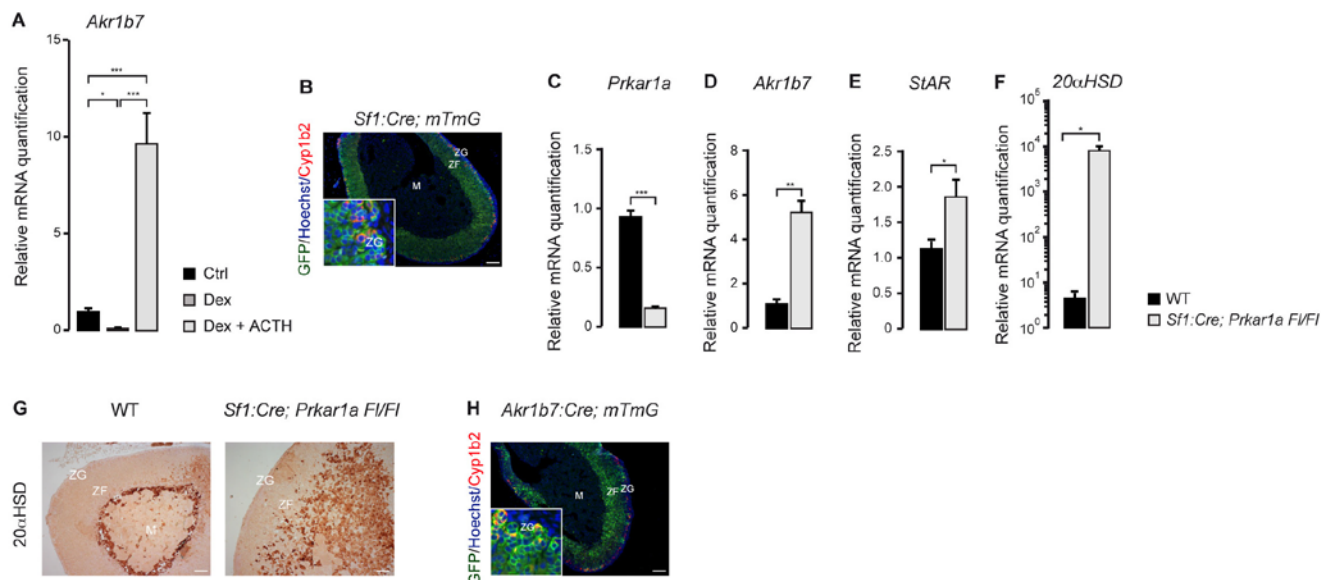
suppressive activity in colorectal cancer. *Nat. Commun.* **5**, 3149 (2014).

41. Suzuki, H. *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* **36**, 417–22 (2004).

42. Lambert-Langlais, S. *et al.* A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* **300**, 197–204 (2009).

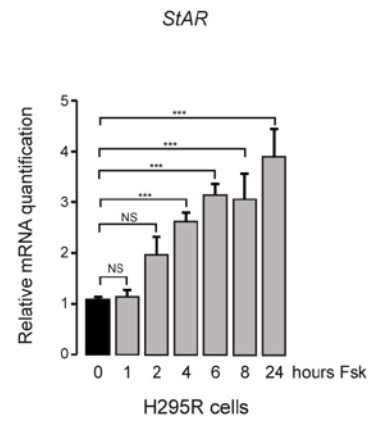
43. Skálhegg, B. S. *et al.* Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **16**, 630–639 (2002).





**Figure S1. A- Dexamethasone and ACTH treatments modulate *Akr1b7* expression.** Wild-type C57/Bl6 mice were treated for 5 days with vehicle (Ctrl) or Dexamethasone (Dex) or for 3 days with dexamethasone followed by two days of Synacthene retard (Dex + ACTH). *Akr1b7* expression levels were then analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from adrenals. Bars represent mean expression in 4 animals per group  $\pm$  SEM. **B- *Sfl1:Cre* induces LoxP recombination in all cortical cells.** *Sfl1:Cre* mice were mated with *mT/mG* reporter mice to generate *Sfl1:Cre;mTmG* offspring. Recombination efficiency was analysed by immunodetection of GFP expression. Sections were also stained with Cyp11b2 (zona glomerulosa) and Hoechst (nuclei). Recombination was induced in all cortical cells including zona glomerulosa (inset). **C- *Prkar1a* expression is decreased in *Sfl1:Cre; Prkar1a Fl/Fl* mice.** *Prkar1a* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from wild-type and *Sfl1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals. **D-E-F *Prkar1a* ablation induces expression of *Akr1b7*, *StAR* and *20αHSD*.** *Akr1b7*, *StAR* and *20αHSD* expression levels were analysed as above. **G- *20αHSD* expression domain is expanded in *Sfl1:Cre Prkar1aFl/Fl* mice.** *20αHSD* expression was analysed by immunohistochemistry in 2.5 month-old nulliparous wild-type and *Sfl1:Cre;Prkar1aFl/Fl* female mice. **H- *Akr1b7:Cre* induces LoxP recombination in a subset of cortical cells.** *Akr1b7:Cre* mice were mated with *mT/mG* reporter mice to generate *Sfl1:Cre;mTmG* offspring. Recombination efficiency was analysed by immunodetection of GFP expression. Sections were also stained with Cyp11b2 (zona glomerulosa) and Hoechst (nuclei). Recombination was induced in a large number of but not all cortical cells, including areas of zona glomerulosa (inset). In C to F, Bars represent mean expression in 6 animals per group  $\pm$  SEM. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (A) or Student's *t* test (C-F). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ . Scale bars represent 100  $\mu$ m. ZG, zona glomerulosa; ZF, zona fasciculata; M, medulla.

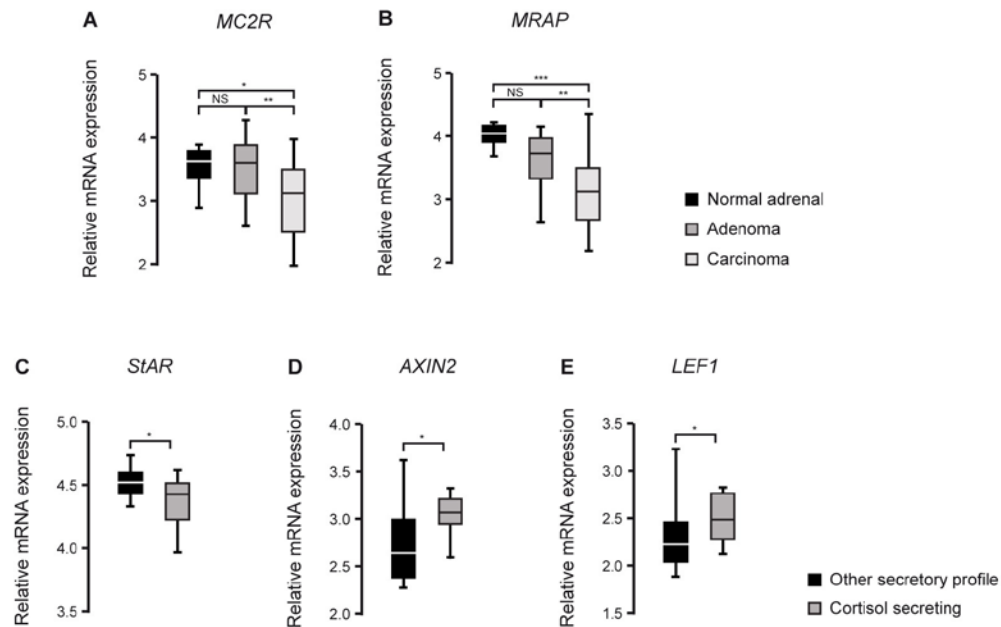




**Figure S2. *StAR* expression is induced by forskolin in H295R cells.** Human H295R cells were treated with either vehicle (0) or Forskolin  $10^{-5}$ M (Fsk) for 1 to 24 h and *StAR* expression was analysed by RTqPCR. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA followed by Dunett's post-hoc test \*\*\*  $p < 0.0005$ ; NS: Not significant.

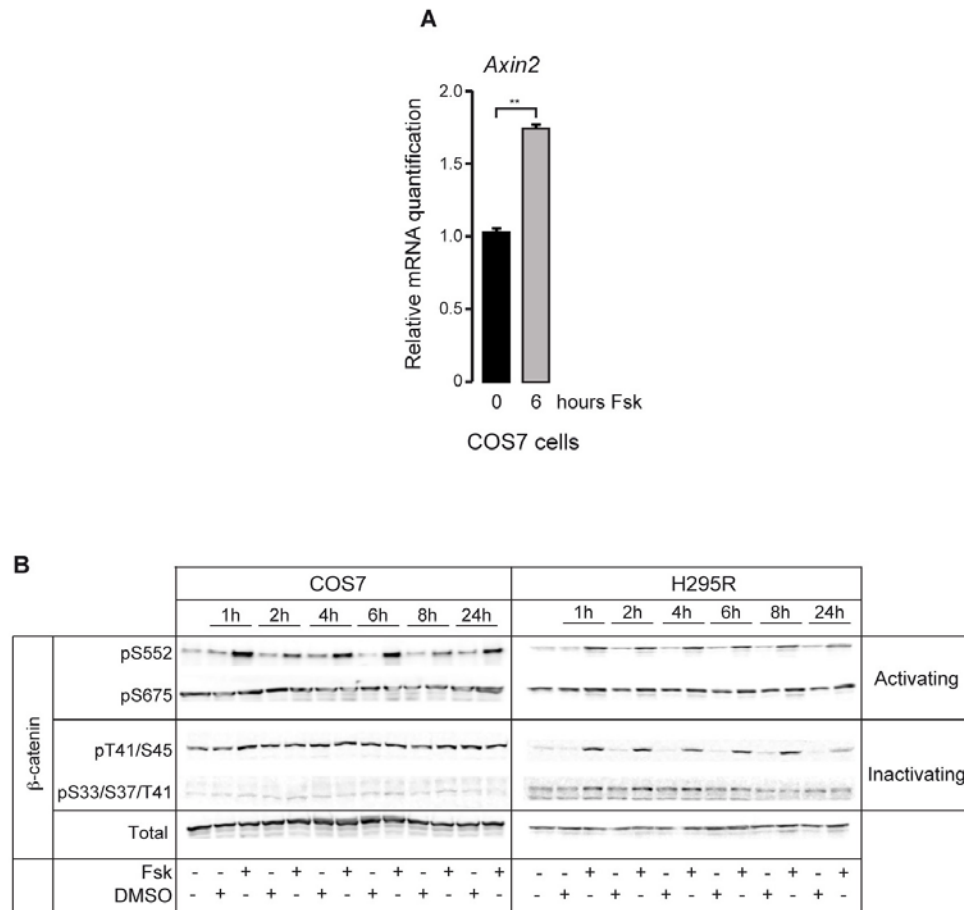






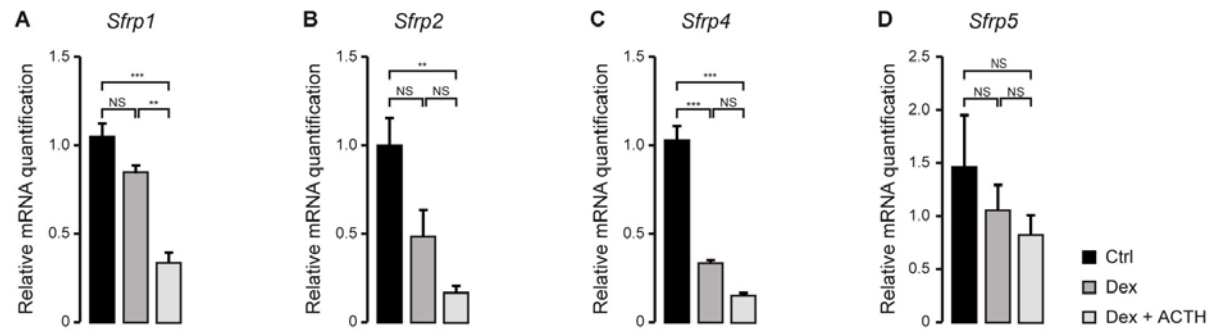
**Figure S3. Retrospective analysis of ACTH signalling and WNT target genes expression in human adrenal tumours. A-B- Down-regulation of *MC2R* and *MRAP* expression in adrenocortical carcinomas.** Relative expression levels of *MC2R* and *MRAP* were retrospectively analysed in publicly available micro-array data <sup>32</sup> representing 10 normal adrenals, 22 adenomas and carcinomas and 32 carcinomas. Statistical analyses were conducted by Kruskal & Wallis followed by Dunn's post-hoc test \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ; NS not significant. **C-E- Concomitant up-regulation of WNT pathway target genes and down-regulation of *StAR* expression in cortisol secreting carcinomas.** Relative expression levels of *StAR* (PKA target gene, C), *AXIN2* and *LEF1* (WNT target genes D-E) were retrospectively analysed in publicly available micro-array data <sup>32</sup> representing 12 cortisol secreting carcinomas and 20 carcinomas with other secretory profiles (secreting other steroids or non secreting). Statistical analyses were conducted by Mann & Whitney test \*  $p < 0.05$ . Boxplots in all panels cover from 25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentile. Whiskers extend from minimal to maximal values. Bars within boxes show median values.





**Figure S4. β-catenin phosphorylation in response to PKA stimulation in H295R and COS7 cells.** A- Forskolin stimulates *AXIN2* expression in COS7 cells. COS7 cells were treated with either vehicle (0), or Forskolin  $10^{-5}$ M for 6h and *AXIN2* expression was evaluated by RTqPCR. B- Differential effects of forskolin on β-catenin phosphorylations in COS7 and H295R cells. COS7 and H295R cells were treated with either vehicle (0), or Forskolin  $10^{-5}$ M for 1 to 24 h. Proteins were extracted and subjected to western-blot analysis with antibodies to phospho-β-catenin, or the corresponding total protein.





**Figure S5. Expression of *Sfrps* is repressed by ACTH treatment.** Wild-type C57/Bl6 mice were treated for 5 days with vehicle (Ctrl) or Dexamethasone (Dex) or for 3 days with dexamethasone followed by two days of Synacthene retard (Dex + ACTH). *Sfrp1* (A), *Sfrp2* (B), *Sfrp4* (C) and *Sfrp5* (D) expression levels were then analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from adrenals. Bars represent mean expression in 4 animals per group  $\pm$  SEM. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ; NS not significant.



Target	Forward	Reverse
mm <i>Akr1b7</i>	5'-GGCTGCCATTCTCAGCTTCAACAG-3'	5'-GCAAGTGGACCTCAGTATTCTCTCG-3'
mm <i>At1a</i>	5'-TCACCTGCATCATCATCTGG-3'	5'-AGCTGGTAAGAATGATTAGG-3'
mm <i>At1b</i>	5'-TCACCTGCATCATCATCTGG-3'	5'-AGCTGGTGAGAATAATAACG-3'
mm <i>Axin2</i>	5'-TGGGGAGTAAGAAACAGCTCC-3'	5'-CCAGCTCCAGTTTCAGTTTCTC-3'
mm <i>Connexin43</i>	Taqman Mm 00439105 m1	
mm <i>Cyp11b2</i>	5'-ATGCTGAGAAGTTGCACCAG-3'	5'-ATTCTGGCCCATTTAGCAAG-3'
mm <i>Lef1</i>	5'-GACGAGCACTTTTCTCCGGG-3'	5'-TGGGGTGATCTGTCCAACGC-3'
mm <i>Prkar1a</i>	5'-CGGGAATGCGAGCTCTATGT-3'	CTCGAGTCAGTACGGATGCC
mm <i>Sfrp1</i>	5'-CGAGTTGAAGTCAGAGGCCAT-3'	5'-CATCCTCAGTGCAAACCTGCG-3'
mm <i>Sfrp2</i>	5'-TCATGGAAACCCTTTGTAAAAATG-3'	5'-CCTTCACTTTGATTTTCAGTGCG-3'
mm <i>Sfrp4</i>	5'-TGGAGCCACCCTTACAGGAT-3'	5'-TTCTGTAGGCTGTCCAGCG-3'
mm <i>Sfrp5</i>	5'-GATGGCCTCATGGAACAGATGT-3'	5'-GCGCATCTTGACCACAAAGTC-3'
mm <i>StAR</i>	5'-TCGCTACGTTCAAGCTGTGT-3'	5'-ACGTCGAACCTGACCCATCC-3'
mm <i>VegfA</i>	Taqman Mm 01281449 m1	
mm <i>Wnt4</i>	5'-CCCTGCTCTTTGGGAAGGTGGTG-3'	5'-CACCTGCTGAAGAGATGGCGTATAC-3'
mm <i>20aHSD</i>	5'-GGCTTTGGCACCTATGCAAC-3'	5'-TGGGTCTGACCAACTCTGGA-3'
mm <i>36b4</i>	5'-GTCACCTGTGCCAGCTCAGAA-3'	5'-TCAATGCTGCCTCTGGAGAT-3'
hs <i>AXIN2</i>	5'-GCTAGCTGAGGTGTCTGAAGCCC-3'	5'-GGCCGAATGATTCTCTCCCTC-3'
hs <i>PPIB</i>	5'-TTTCATCTGCACTGCCAAGA-3'	5'-TTGCCAAACACCACATGCT-3'
hs <i>StAR</i>	5'-ATGAGTAAAGTGGTCCCAGATG-3'	5'-ACCTTGATCTCCTTGACATTGG-3'
hs <i>WNT4</i>	5'-AACCGGCGCTGGAACCTGCTC-3'	5'-AGCCACCGTAGGCGATGT-3'

**Supplementary Table S1 : Sequences of primers used for RTqPCR**



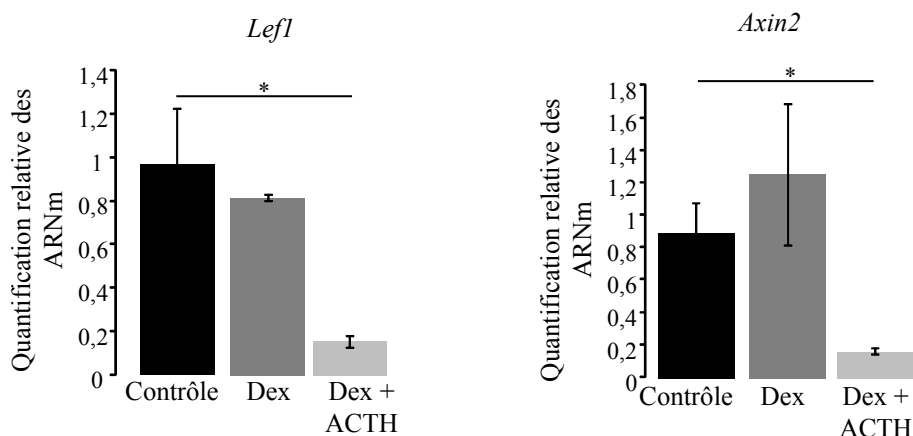


# PERSPECTIVES



Le cortex surrénalien s'organise en deux zones fonctionnellement distinctes, la glomérulée, qui produit de l'aldostérone sous le contrôle du système rénine-angiotensine, et la fasciculée, qui produit de la corticostérone sous le contrôle de l'ACTH. La zonation fonctionnelle du cortex est établie en période périnatale et se maintient tout au long de la vie de l'individu, alors même que le cortex est continuellement renouvelé par le recrutement de progéniteurs localisés dans la zone capsulaire/sous-capsulaire (King et al., 2009). Ce renouvellement repose sur la migration centripète des cellules progénitrices (de la capsule vers la medulla) qui acquièrent séquentiellement une identité glomérulée, puis une identité fasciculée au cours de leur transit (Freedman et al., 2013; King et al., 2009). L'ensemble de ces observations indique qu'en fonction de leur position dans le cortex, les cellules reçoivent des signaux déterminant le programme de différenciation approprié. L'analyse de modèles génétiques a permis de montrer que la différenciation glomérulée repose en partie sur l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine qui stimule l'expression de gènes spécifiques de cette zone (*At1r* et *Cyp11b2*) et inhibe l'expression de gènes spécifiques de la zone fasciculée (*Mc2r* et *Cyp11b1*) (Berthon et al., 2014; Walczak et al., 2014). L'identité fasciculée repose sur la signalisation AMPc/PKA mobilisée par l'ACTH au travers de son récepteur *Mc2r* qui est essentiel à sa différenciation (Chida et al., 2007), en permettant notamment l'expression de *Cyp11b1*. L'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans la zone fasciculée conduit à la différenciation ectopique de cellules de zone glomérulée (Berthon et al., 2010). Ceci indique que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine doit être inhibée pour permettre la transition de l'identité glomérulée vers l'identité fasciculée.

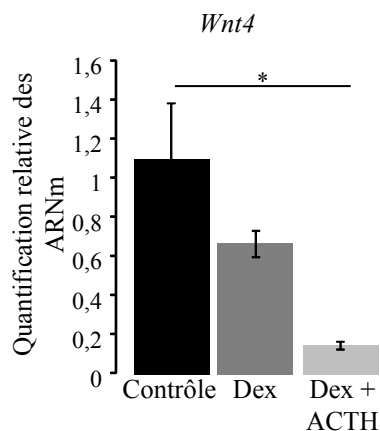
Dans le travail présenté ici, nous avons montré à l'aide d'approches pharmacologiques et génétiques, que l'activation de la signalisation PKA permettait d'inhiber la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, favorisant l'acquisition de l'identité fasciculée au détriment de l'identité glomérulée. Nos travaux montrent que l'inhibition de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par la PKA pourrait passer par l'inhibition de l'expression de *Wnt4*, observée dans les modèles murins et dans les cellules de CCS humaines H295R en réponse à l'activation de la PKA. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une perte de l'identité glomérulée en réponse à l'inactivation de *Wnt4* dans le cortex. L'ensemble de ces observations permet de proposer un modèle dans lequel l'expression de *Wnt4* dans la zone glomérulée permet l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Ceci induit le programme de différenciation glomérulée et inhibe la différenciation fasciculée, notamment en réprimant l'expression de *Mc2r*. Au cours de leur migration, les cellules échappent progressivement à l'influence de *Wnt4*. Ceci permet



**Figure 54** : Le traitement ACTH inhibe l'expression des gènes cibles de la  $\beta$ -caténine dans les surrénales des souris  $\Delta$ Cat.

Quantification relative de l'expression de *Lef1* et *Axin2* dans les surrénales des souris  $\Delta$ Cat après 5 jours de traitement véhicule (contrôle), à la dexaméthasone (Dex) ou après 3 jours de dexaméthasone suivie de 2 jours d'ACTH (Dex + ACTH).

ANOVA \*  $p \leq 0.05$



**Figure 55** : Le traitement ACTH inhibe l'expression de *Wnt4* dans les surrénales des souris  $\Delta$ Cat.

Quantification relative de l'expression de *Wnt4* dans les surrénales des souris  $\Delta$ Cat après 5 jours de traitement véhicule (contrôle), à la dexaméthasone (Dex) ou après 3 jours de dexaméthasone suivie de 2 jours d'ACTH (Dex + ACTH).

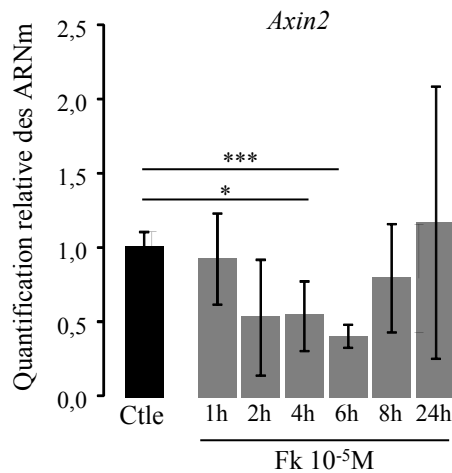
ANOVA \*  $p \leq 0.05$

l'expression de *Mc2r* et l'activation de la signalisation PKA qui verrouille définitivement l'expression de *Wnt4* et l'activité de la voie Wnt. Ceci permet l'engagement des cellules dans la différenciation fasciculée.

Au delà des mécanismes moléculaires de la zonation, nous avons également montré que l'effet inhibiteur de la PKA sur la signalisation Wnt était capable de s'opposer aux effets oncogéniques de la  $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale. Ainsi, alors que l'invalidation de la sous-unité régulatrice  $RI\alpha$  freine la prolifération induite par la  $\beta$ -caténine, l'invalidation hétérozygote de la sous-unité catalytique  $C\alpha$  stimule la tumorigénèse induite par la  $\beta$ -caténine et conduit au développement de tumeurs agressives dès 6 mois (contre 18 pour l'activation de la  $\beta$ -caténine seule). Ces observations pourraient avoir des implications cliniques, l'expression de *MC2R* et de son partenaire *MRAP* étant réduite dans les CCS.

#### **A/ Mécanismes d'inhibition de la $\beta$ -caténine par la PKA**

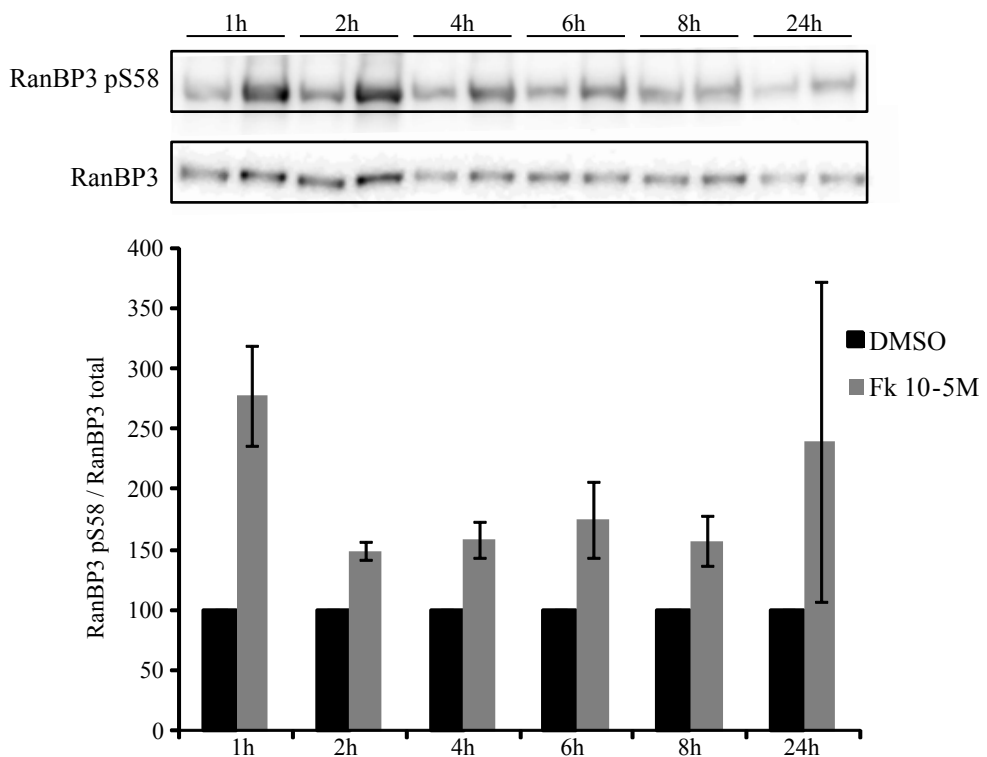
Nous avons montré que l'effet inhibiteur de la PKA sur la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans le contexte de la zonation, pouvait s'expliquer par l'inhibition de l'expression de *Wnt4*. Nos données reposant sur l'invalidation de la sous-unité régulatrice  $RI\alpha$  ( $\Delta$ Cat; *Prkar1a* Fl/Fl; Akr1b7:Cre) ou au contraire sur l'invalidation hétérozygote de la sous-unité catalytique  $C\alpha$  ( $\Delta$ Cat; *Prkaca*<sup>+/-</sup>; Akr1b7:Cre) dans les surrénales des souris  $\Delta$ Cat, montrent que la signalisation PKA peut aussi s'opposer à l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine. Ces observations sont confirmées par l'inhibition de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en réponse à la forskoline dans les cellules H295R qui portent une mutation activatrice du gène *CTNNB1* (Tissier et al., 2005) et par l'effet inhibiteur de l'ACTH sur l'expression de *Lef1* et *Axin2* chez des souris  $\Delta$ Cat (Figure 54). Dans ce contexte particulier, se pose la question du rôle de l'inhibition de *Wnt4* sur l'activité de la voie. En effet, même si les formes mutées de la  $\beta$ -caténine ( $\Delta$ Cat et H295R) sont considérées indépendantes des ligands, des données expérimentales suggèrent qu'elles conservent une certaine sensibilité aux modulateurs naturels de la voie. Ainsi, dans des cellules de cancer colorectal HCT116, portant une mutation activatrice de *CTNNB1*, la surexpression du ligand Wnt1 induit une stimulation de l'activité de la  $\beta$ -caténine. A l'inverse, la réexpression dans ces cellules des inhibiteurs de la famille SFRP se traduit par une diminution de la transcription dépendante de la  $\beta$ -caténine (Suzuki et al., 2004). La diminution d'expression de *Wnt4* induit par l'activation de la PKA



**Figure 56** : L'activation de la PKA dans les cellules ATC7xi diminue l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.

Quantification relative de l'expression de *Axin2* dans les cellules ATC7xi traitées à la forskoline (Fk) pour le temps indiqué.

ANOVA \*  $p \leq 0.05$  ; \*\*  $p \leq 0.01$  ; \*\*\*  $p \leq 0.001$



**Figure 57** : Augmentation de la phosphorylation de RanBP3 après activation de la PKA dans les cellules ATC7xi.

La phosphorylation de RanBP3 sur sa sérine 58 a été analysée par western blot à partir des protéines extraites des cellules ATC7xi traitées à la forskoline ou au DMSO pour le temps indiqué. Les niveaux ont été normalisés par rapport à la protéine RanBP3 totale. L'histogramme représente la quantification de deux expériences indépendantes.

pourrait également être un mécanisme permettant de rendre compte de l'interaction négative de la PKA sur la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, même quand celle-ci est constitutivement active. Dans ce sens, nous observons une diminution d'expression de *Wnt4* chez les souris  $\Delta$ Cat traitées à l'ACTH (Figure 55) et dans les cellules H295R induites à la forskoline. Toutefois, la seule diminution du ligand Wnt4 pourrait ne pas être le seul mécanisme permettant à la PKA d'inhiber la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.

Une autre piste envisageable repose sur une augmentation de l'export nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Pour valider cette hypothèse, nous proposons d'étudier la dynamique de localisation de la  $\beta$ -caténine en transfectant des cellules cortico-surrénaliennes avec une construction permettant de suivre la localisation de la  $\beta$ -caténine par microscopie confocale (GFP- $\beta$ -caténine, par exemple). Pour ce faire, nous disposons de cellules cortico-surrénaliennes murines exprimant une  $\beta$ -caténine sauvage (ATC7xi) et des cellules H295R. Le suivi sera effectué en réponse à la forskoline ou l'ACTH, en présence ou non de BIO (stimulateur de la voie Wnt). Ces expériences seront complétées par l'analyse en western-blot de la localisation de la  $\beta$ -caténine endogène après fractionnement nucléo-cytoplasmique. Ceci permettra notamment de localiser les formes actives et inactives de la  $\beta$ -caténine en fonction de leurs phosphorylations. Enfin, nous analyserons le niveau de recrutement de la  $\beta$ -caténine sur ses gènes cibles, par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP).

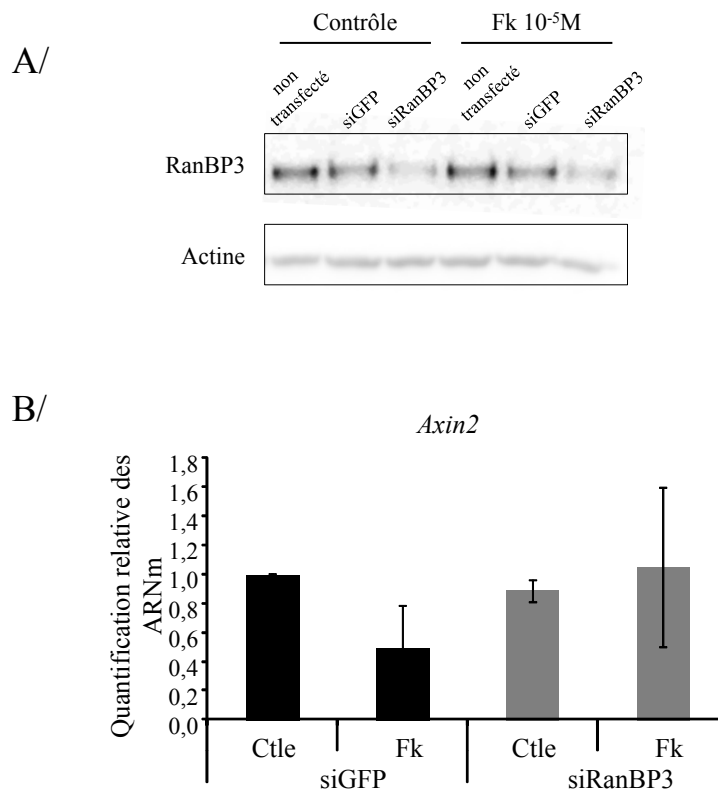
La protéine RanBP3 pourrait être un acteur pertinent de l'export nucléaire de la  $\beta$ -caténine. En effet, elle a la capacité d'exporter les formes sauvage et mutée de la  $\beta$ -caténine hors du noyau (Hendriksen et al., 2005) et peut être modulée par la phosphorylation de sa sérine 58 (Knethen et al., 2010; Yoon et al., 2008). Cette phosphorylation, en réponse à la kinase ERK, participe notamment à l'export nucléaire de PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) dans des cellules HEK293 (Knethen et al., 2010). Même si la phosphorylation de ce site n'a pas été associée à la PKA, la sérine 58 est localisée dans un consensus canonique de type RXXS/T. L'activation de la voie de signalisation PKA pourrait donc induire une stimulation de l'activité d'export de la  $\beta$ -caténine par RanBP3. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons analysé l'état de phosphorylation de la sérine 58 de RanBP3 après activation de la PKA par un traitement forskoline dans les cellules ATC7xi, qui présentent également une diminution de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine lors de l'activation de la PKA (Figure 56). Une augmentation de phosphorylation de RanBP3 est observée dès 1h de traitement et se maintient jusqu'à 24h de traitement (Figure 57). Ces résultats suggèrent





**Figure 58 : Augmentation de la phosphorylation de RanBP3 dans les surrénales des animaux invalidés pour la sous-unité régulatrice RI $\alpha$ .**

La phosphorylation de RanBP3 sur sa sérine 58 a été analysée par western-blot à partir de protéines extraites de surrénales de souris sauvages et *Prkar1a* *Fl/Fl*; *Akr1b7:Cre*.



**Figure 59 : Dans les cellules ATC7xi, l'expression de *Axin2* n'est plus diminuée après transfection de siARN dirigés contre RanBP3.**

**A/** Mesure de l'accumulation de la protéine RanBP3 par western blot après transfection de siARN contrôle (siGFP) ou dirigés contre RanBP3 (siRanBP3) dans des cellules ATC7xi.

**B/** Quantification relative de l'expression de *Axin2* par RTqPCR dans les cellules ATC7xi transfectées avec des siGFP ou des siRanBP3. Après transfection les cellules ont été traitées pendant 6h à la forskoline (Fk) à 10<sup>-5</sup>M ou au DMSO (Ctle).

donc que la PKA a la capacité de phosphoryler RanBP3 sur sa sérine 58. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'une augmentation de phosphorylation de la sérine 58 de RanBP3 dans la cortico-surrénale de souris invalidées pour la sous-unité RI $\alpha$  de la PKA (*Prkar1a Fl/Fl ; Akr1b7:Cre*, Figure 58). Nous devons toutefois encore confirmer que la PKA phosphoryle directement RanBP3 par l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie et des voies PI3K/AKT et MAPK, déjà décrites comme impliquées dans la phosphorylation de ce résidu (Knethen et al., 2010; Yoon et al., 2008) et qui peuvent être mobilisées par la PKA (Bornfeldt and Krebs, 1999; de Jossineau et al., 2014). Des expériences d'immunoprécipitation seront également menées, afin de mettre en évidence une interaction entre la sous-unité catalytique de la PKA et RanBP3. Dans le but de déterminer si RanBP3 pouvait être impliqué dans l'inhibition de la  $\beta$ -caténine en réponse à la PKA, nous avons diminué son expression par interférence ARN dans les cellules ATC7xi et analysé l'état d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Nos résultats préliminaires montrent que l'expression de *Axin2* n'est plus inhibée par la forskoline quand l'expression de RanBP3 est réduite (Figure 59). Ainsi, la PKA pourrait favoriser l'export nucléaire de la  $\beta$ -caténine en stimulant (directement ou indirectement) l'activité de RanBP3 par phosphorylation. Ces expériences n'étant que préliminaires, elles doivent être répétées afin de confirmer les résultats. D'autre part, nous confirmerons l'implication de la phosphorylation de RanBP3 pour l'export nucléaire de la  $\beta$ -caténine en réexprimant la forme sauvage ou mutée de RanBP3 sur sa sérine 58 (mutation phospho-inactive) après inhibition de RanBP3 endogène par interférence ARN. Enfin, nous confirmerons la phosphorylation de RanBP3 dans le modèle murin d'activation constitutive de la PKA (*Prkar1a Fl/Fl ; Sfl:Cre*) ainsi que dans les surrénales des souris traitées à l'ACTH.

Une autre possibilité, non mutuellement exclusive, pour expliquer l'effet inhibiteur de l'activation de la signalisation PKA sur la  $\beta$ -caténine pourrait être un titrage des co-facteurs de la  $\beta$ -caténine, tels que CBP et p300 qui sont utilisés par le facteur CREB (Mayr and Montminy, 2001), mobilisé par la PKA dans la cortico-surrénale. Ce mécanisme a notamment été démontré dans des kératinocytes humains pour la signalisation TGF $\beta$ /SMAD. En effet, l'induction de la PKA dans ces cellules réduit l'activité transcriptionnelle des SMAD sans modifier leur import nucléaire mais par la réduction de l'interaction des SMAD avec CBP ou p300 (Schiller et al., 2003). Afin d'étudier cette hypothèse, un CHIP de CBP et p300 sur les gènes cibles  $\beta$ -caténine pourra être réalisé dans les cellules H295R après activation de la PKA. D'autre part, le taux de p300 étant limité dans le noyau (Hottiger et al., 1998), nous pourrions le surexprimer dans les cellules cortico-surrénaliennes. Si la surexpression de p300



contourne l'effet inhibiteur de la PKA sur la  $\beta$ -caténine, nous pourrions alors en conclure que sa titration par l'activation de la signalisation PKA est responsable de l'inhibition de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Dans le même ordre d'idée, on peut également imaginer une titration de la  $\beta$ -caténine par le récepteur nucléaire Sfl. En effet, ces deux facteurs interagissent physiquement (Gummow et al., 2003; Salisbury et al., 2007) et l'inhibition de Sfl par siARN induit une augmentation d'expression de *AXIN2* et *CCND2*, deux gènes cibles de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Ehrlund et al., 2012). Réciproquement, la  $\beta$ -caténine est capable d'inhiber l'expression de gènes cibles de Sfl (Walczak et al., 2014). Dans la cortico-surrénale, l'activité de Sfl étant mobilisée par la signalisation PKA (Schimmer and White, 2010), on peut supposer que la mobilisation de Sfl induise une titration de la  $\beta$ -caténine de ses gènes cibles canoniques mais également de *Nurr1*, *Nurr77*, *Cyp21* et *At1R*. Ceci pourra être évalué par des analyses de co-immunoprécipitation  $\beta$ -caténine-Sfl et de CHIP sur les régions régulatrices des gènes concernés. Nous pourrions également évaluer le rôle de Sfl dans l'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en diminuant son expression par interférence ARN. L'existence d'un tel mécanisme pourrait contribuer à la spécificité tissulaire du phénotype, Sfl étant essentiellement exprimé dans les tissus stéroïdogènes.

Enfin, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine étant une signalisation soumise à de nombreux points de contrôle, d'autres acteurs de ce contrôle pourraient être mobilisés par la PKA. Nous proposons de les identifier par une approche transcriptomique reposant sur la comparaison du profil d'expression génique de cellules cortico-surrénaliennes en absence et en présence de forskoline. Une fois les acteurs pertinents identifiés, nous pourrions valider leur implication dans le processus, par interférence ARN.

Contrairement à d'autres tissus dans lesquels la PKA stimule l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la cortico-surrénale semble présenter un contexte cellulaire particulier conduisant à un effet inhibiteur de la PKA, même dans un contexte d'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine. L'ensemble des expériences proposées ici devrait nous permettre d'identifier les acteurs de cette interaction inattendue, impliquée à la fois dans le contrôle de l'homéostasie corticale et dans les phénomènes de tumorigenèse. A terme, il serait intéressant de réaliser une étude comparée de ces acteurs et des mécanismes mobilisés dans des tissus dans lesquels la PKA stimule la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et dans la cortico-surrénale.



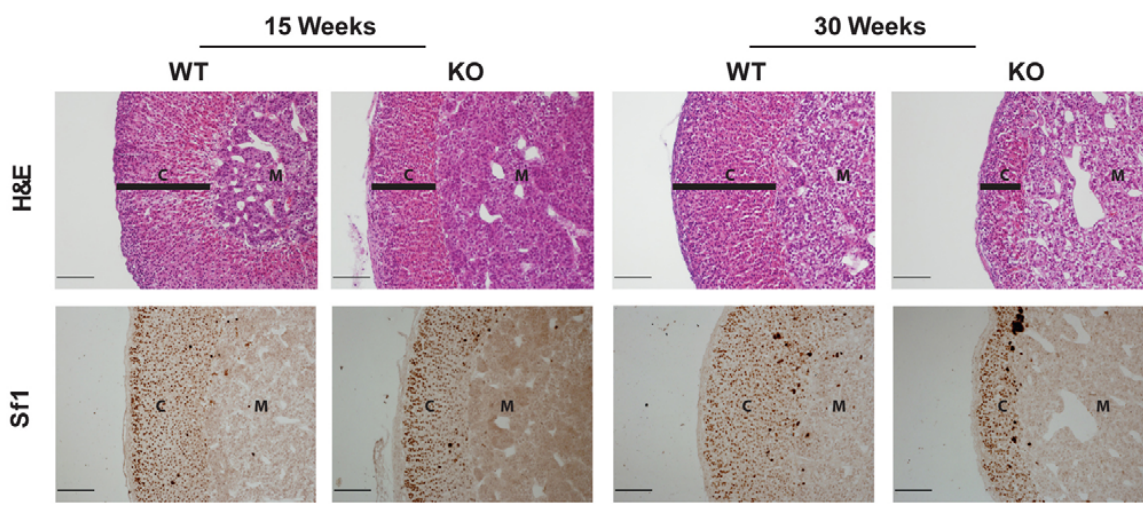
## **B/ Pertinence clinique de l'inhibition des propriétés oncogéniques de la $\beta$ -caténine**

Dans l'intestin, les voies PKA et  $\beta$ -caténine coopèrent afin d'accélérer le développement tumoral (Brudvik et al., 2011; van Veelen et al., 2011). Nos résultats montrent qu'au contraire, l'inactivation hétérozygote de la sous-unité catalytique de la PKA est suffisante pour provoquer une forte accélération de la tumorigenèse dans la cortico-surrénale. Se pose alors la question de la pertinence clinique de ces observations. Des études anciennes sur de petites cohortes de tumeurs avaient mis en évidence une perte d'hétérozygotie du gène codant MC2R dans les carcinomes cortico-surrénaliens (Reincke et al., 1997). L'analyse rétrospective du transcriptome d'une plus large cohorte de patients met en évidence une diminution significative d'expression de *MC2R* et de son partenaire *MRAP* dans les CCS par rapport aux surrénales saines ou aux adénomes. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation avec les niveaux d'expression des gènes cibles de la  $\beta$ -caténine *LEF1* et *AXIN2*. Malgré tout, les patients porteurs de CCS sécréteurs de cortisol chez qui l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est inhibé, présentent une augmentation significative d'expression de ces deux facteurs. Il est donc possible qu'une diminution de la signalisation PKA soit associée à l'agressivité des tumeurs et à l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.

Il serait intéressant d'étudier cette hypothèse sur la base de l'ensemble des données transcriptomiques et de séquençage d'exons disponibles. On pourrait alors identifier de nouveaux acteurs pertinents de la tumorigenèse cortico-surrénalienne, impliqués dans le contrôle du croisement des voies de signalisation Wnt et PKA.

## **C/ Implication de la $\beta$ -caténine dans la différenciation de la zone glomérulée**

Les données de l'équipe ont démontré que l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale induit une différenciation ectopique de cellules de glomérulée (Berthon et al., 2010). La  $\beta$ -caténine est donc un facteur important pour la différenciation de cette zone. L'observation de cellules exprimant Cyp11b2 chez les souris invalidées pour *Wnt4* suggère soit que d'autres ligands Wnt sont capables de stimuler la voie, soit qu'un certain degré de différenciation de la zone glomérulée peut être observé en absence d'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Malheureusement, l'invalidation de la  $\beta$ -caténine dans l'ensemble du cortex (*Ctnnb1*<sup>Fl/Fl</sup>; *Sfl:Cre*) bloque le développement de la cortico-surrénale, ne permettant

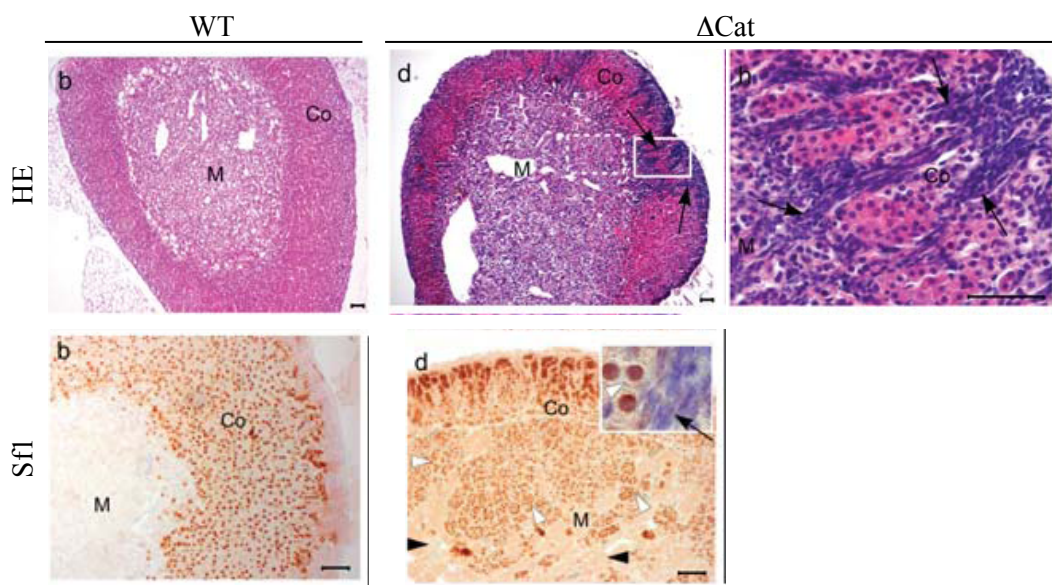


**Figure 60 : Atrophie progressive du cortex surrénalien des souris invalidées pour la  $\beta$ -caténine à l'aide d'une Cre à faible activité de recombinaison.**

En haut, coloration hématoxyline/éosine (HE) de coupes de surrénales contrôles (WT) et KO.

En bas, immunohistochime de Sf1 sur des coupes de surrénales contrôles (WT) et KO.

D'après Kim et al., 2008.



**Figure 61 : Accumulation de cellules sous-capsulaires non différenciées dans les surrénales des souris  $\Delta$ Cat.**

En haut, coloration hématoxyline/éosine (HE) de coupes de surrénales contrôles (WT) et  $\Delta$ Cat.

En bas, immunohistochime de Sf1 sur des coupes de surrénale contrôle (WT) et  $\Delta$ Cat.

D'après Berthon et al., 2010.

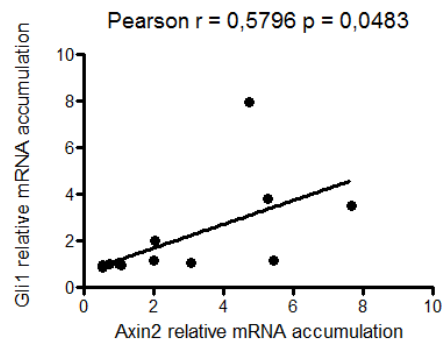
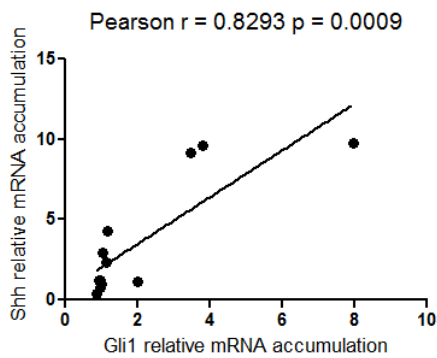
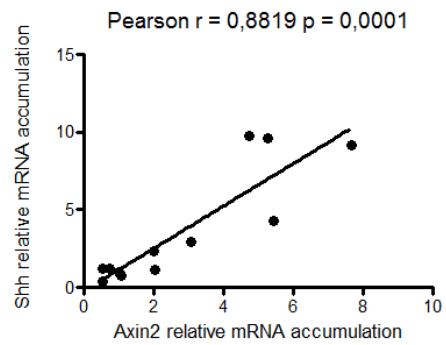
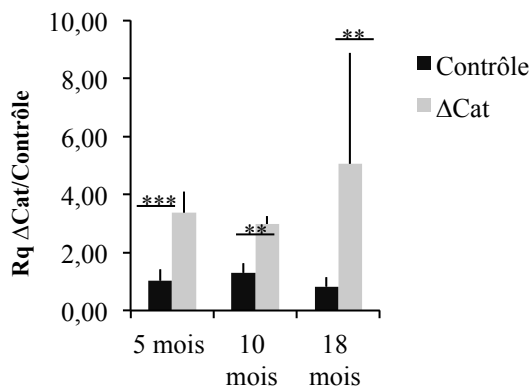
pas d'évaluer l'implication de la  $\beta$ -caténine dans l'établissement de la zone glomérulée (Kim et al., 2008a). Afin de répondre à cette question, nous proposons donc d'invalider la  $\beta$ -caténine spécifiquement dans la zone glomérulée. Dans ce but, les souris portant des sites LoxP de part et d'autre des exons 2 et 6 du gène *Ctnnb1* (*Ctnnb1*<sup>F1/F1</sup>) (Brault et al., 2001) seront croisées avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur *Cyp11b2* (AS<sup>+Cre</sup>) (Freedman et al., 2013). Si la  $\beta$ -caténine est totalement indispensable à l'acquisition de l'identité glomérulée, ces animaux devraient présenter une perte de différenciation de cette zone.

Le renouvellement du cortex surrénalien étant basé sur la différenciation de cellules progénitrices en cellules de glomérulée puis de fasciculée, la perte de la glomérulée dans le modèle AS<sup>+Cre</sup>; *Ctnnb1*<sup>F1/F1</sup> pourrait induire des défauts de renouvellement et des altérations de la zone fasciculée. En effet, si l'acquisition de l'identité glomérulée est requise pour la différenciation fasciculée, des défauts de renouvellement du cortex et donc une atrophie du cortex pourraient être observés au cours du vieillissement des souris. Toutefois, il semble existe des mécanismes alternatifs de différenciation fasciculée sans passer par une identité glomérulée. En effet, dans le modèle invalidé pour *Sfl* spécifiquement dans la glomérulée (AS<sup>+Cre</sup>; *Sfl*<sup>F1/F1</sup>), une désorganisation de la zone glomérulée est observée, accompagnée d'une diminution d'expression de *Cyp11b2*, marqueur de la zone glomérulée (Freedman et al., 2013). La zone fasciculée n'étant pas altérée dans ce modèle, malgré les défauts de différenciation de la zone glomérulée, des mécanismes alternatifs permettant la différenciation et/ou le maintien de la zone fasciculée doivent être mis en jeu (Freedman et al., 2013). Ces mécanismes pourraient être mis en place dans le modèle AS<sup>+Cre</sup>; *Ctnnb1*<sup>F1/F1</sup>.

#### **D/ Implication de la $\beta$ -caténine dans le renouvellement cellulaire**

L'invalidation de la  $\beta$ -caténine dans l'ensemble du cortex grâce à une Cre à faible activité de recombinaison induit une atrophie progressive du cortex au cours du vieillissement (Figure 60) (Kim et al., 2008a). A l'inverse, l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine induit une accumulation de cellules sous-capsulaires fibroblastiques indifférenciées (Sfl-), pouvant correspondre à des progéniteurs surrénaliens (Figure 61) (Berthon et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère que la  $\beta$ -caténine joue un rôle important dans le renouvellement cortical. Toutefois, la faible prolifération des cellules répondant à la signalisation Wnt dans le





**Figure 62** : Analyse de l'expression des acteurs de la voie Hedgehog dans les surrénales des souris  $\Delta$ Cat.

A/ Analyse de l'expression de *Shh* par RTqPCR. Test t de Student \*  $p \leq 0.05$  ; \*\*  $p \leq 0.01$  ; \*\*\*  $p \leq 0.001$

B/ Corrélation de l'expression de *Shh* et *Axin2*.

C/ Corrélation de l'expression de *Shh* et *Gli1*.

D/ Corrélation de l'expression de *Gli1* et *Axin2*.

cortex suggère que cet effet est probablement indirect (Walczak et al., 2014). Dans la cortico-surrénale, la prolifération et le maintien des cellules progénitrices capsulaires sont dépendants de *Shh*, dont l'inactivation dans les cellules *Sf1*<sup>+</sup> entraîne une réduction de la taille des surrénale et un amincissement de la capsule, associé à une diminution de prolifération des cellules capsulaires (Huang et al., 2010; King et al., 2009). La majorité des cellules exprimant *Shh* dans la cortico-surrénale adulte, correspond aux cellules qui répondent au signal Wnt (Walczak et al., 2014). D'autre part, une augmentation de l'expression de *Shh*, corrélée à l'augmentation d'expression de *Axin2*, a été mise en évidence dans les surrénales des souris présentant une activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans le cortex (Figure 62A et B, résultats non publiés, Annabel Berthon). Chez ces mêmes souris, une augmentation de l'expression de *Gli1*, corrélée à l'expression de *Shh* et d'*Axin2*, a été observée (Figure 62 C et D, résultats non publiés, Annabel Berthon). L'ensemble de ces données suggère que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle important dans le renouvellement cortical en stimulant l'expression de *Shh* et le recrutement de progéniteurs corticaux.

Le croisement des souris  $\Delta$ Cat avec des souris possédant un rapporteur *Gli1* : LacZ permettra de confirmer que les cellules fibroblastiques accumulées dans le cortex de ces animaux correspondent à des cellules capsulaires. D'autre part, des expériences de ChIP à partir des surrénales des souris  $\Delta$ Cat permettront de mettre en évidence un effet direct de la  $\beta$ -caténine sur le contrôle de l'expression de *Shh*. Enfin, nous pourrions également inactiver *Shh* chez les souris  $\Delta$ Cat en les croisant avec l'allèle conditionnel *Shh*<sup>F1/F1</sup> afin d'évaluer le recrutement de cellules capsulaires/sous-capsulaires et la contribution de ces mécanismes au processus de développement tumoral. Cette dernière question est d'autant plus intéressante que de récentes études mettent en évidence une dérégulation de la voie de signalisation Hedgehog dans les CCS (Gomes et al., 2014; Werminghaus et al., 2014).



# ANNEXES



Article 3 :

*Adrenocortical Cancer and IGF2: Is the Game Over or Our Experimental Models Limited?*

Drelon C, Berthon A, Val P.

J Clin Endocrinol Metab. 2013, Commentary



## Adrenocortical Cancer and IGF2: Is the Game Over or Our Experimental Models Limited?

Coralie Drelon, Annabel Berthon, and Pierre Val

Clermont Université (C.D., A.B., P.V.), Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement (GReD), F-63012 Clermont-Ferrand Cedex 1, France; Centre National de la Recherche Scientifique (C.D., A.B., P.V.), Unité Mixte de Recherche 6293, GReD, F-63171 Aubière Cedex, France; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1103 (C.D., A.B., P.V.), GReD, F-63171 Aubière Cedex, France

**A**drenocortical cancer (ACC) is a rare (0.5–2 cases per million per year) but aggressive disease with low survival rates of 16 to 47%, depending on the clinical series. Although mitotane alone or in combination with chemotherapy can improve patients' survival, there is no efficient treatment of metastatic ACC, which is found in almost half of the patients at diagnosis. Identification of the molecular underpinnings of ACC may open the way to targeted therapy of this aggressive cancer. Over the last 20 years, considerable concerted effort has led to the identification of molecular alterations in patients' samples that may drive the tumorigenic process. One of the breakthroughs in this long process was the discovery by Gicquel et al (1) in 1994 that the growth factor IGF2 was markedly overexpressed in about 80–90% of adrenocortical carcinomas compared with adenomas or healthy adrenals (1). This seminal report was followed by a number of larger-scale studies that confirmed that *IGF2* was the most up-regulated gene in ACC. These studies also showed overexpression of the *IGF2* and IGF-I receptor (IGF-IR) and of one IGF binding protein (IGFBP2) in adrenal carcinomas (reviewed in Ref. 2).

IGF2 is a growth factor that signals through the MAPK and phosphatidylinositol-3-kinase pathways, which stimulate proliferation and inhibit apoptosis in a number of cell types. *IGF2* is expressed from the paternal allele at the maternally imprinted 11p15 locus. A possible involvement of IGF2 in adrenal tumorigenesis was initially postulated because of the presence of adrenocortical adenomas and carcinomas in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome, a disease resulting from structural alter-

ations at 11p15 that cause overexpression of *IGF2* and deregulation of other genes in the locus (reviewed in Ref. 3). In sporadic adrenocortical carcinomas, overexpression of *IGF2* is frequently associated with loss of the maternal allele and duplication of the paternal allele, resulting in biallelic expression of the gene (1). Overexpression of *IGF2* is a strong independent predictor of shorter disease-free survival (4), and immunohistochemistry for IGF2 has been proposed as an efficient diagnostic tool. Consistent with a potential role of IGF2 in adrenal tumorigenesis, inhibition of IGF-IR signaling by a tyrosine kinase inhibitor (NVP-AEW541) or a specific blocking antibody (IMC-A12) reduced ACC cell proliferation and tumor formation in nude mice (reviewed in Ref. 2). This suggested that IGF signaling could be an interesting therapeutic target in the context of ACC. However, phase I trials aiming at evaluating the feasibility of IGF-IR (figitumumab and OSI-906) and insulin receptor (OSI-906) inhibition in ACC have only shown one partial response by Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) criteria (OSI-906 protocol) out of a total of 25 patients (5, 6). The observation that some patients displayed stable disease after 3 months on the 2 protocols could be considered encouraging. This will have to be further evaluated in light of the ongoing advanced clinical trials.

Although the robust expression of IGF2 in ACC suggests a possible involvement in tumor initiation and/or progression, this is generally accompanied by deregulation of the whole 11p15 locus, which encompasses potential tumor suppressors such as H19 and P57KIP2 and potential oncogenes such as the recently described micro-





RNA hsa-miR483. To elucidate the specific role of IGF2 in adrenocortical tumorigenesis, our team (7) and Hammer's group (8) have used distinct genetic strategies to induce *Igf2* overexpression alone or in combination with constitutive Wnt pathway activation in transgenic mice. We achieved overexpression of *Igf2* in the adrenal cortex through the regulatory regions of *Akr1b7* or *CYP11A1*. Both promoters allow expression of transgenes in all steroidogenic cells of the adrenal cortex. Hammer's group (8) used a mouse model in which the endogenous *Igf2/H19* imprinting control region was specifically deleted in some Sf-1-positive cells in the adrenal cortex, which resulted in stochastic biallelic expression of *Igf2*. These 3 different genetic models allowed levels of *Igf2* expression ranging from 2- to 87-fold of that found in control mice, which was in the range of *IGF2* overexpression in patients (7- to 582-fold) (8, 9). However, there was no adrenal tumor development or even hyperplasia in any of the transgenic models over a time course of 14 months, although the IGF signaling pathway was activated (7, 8). These observations are in line with previous reports in mouse models of Beckwith-Wiedemann syndrome and confirm analyses relying on incidental phosphoenolpyruvate carboxykinase-driven overexpression of IGF2 in the adrenal cortex of transgenic mice (10). Interestingly, we showed increased proliferation in the adrenal cortices of *Igf2*-overexpressing mice, which was in line with the effect of IGF signaling inhibition in human adrenocortical tumor cell lines. However, this was not associated with tumor development. Although one can never rule out that interspecies differences might complicate interpretation of the phenotypes, it seems sensible to conclude that IGF2 overexpression can accelerate cell proliferation in both human and mouse adrenocortical cells. However, in contrast with  $\beta$ -catenin (11), it is not sufficient as a single alteration to further promote adrenocortical cell transformation through acquisition of secondary alterations.

Constitutive Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation is the second most frequent molecular alteration in adrenal cortex tumors (reviewed in Ref. 12). However, unlike overexpression of IGF2, this alteration is found at similar frequencies in benign (51% [13]) and malignant (39.2% [14]) tumors in patients. We have shown that stabilization of  $\beta$ -catenin by Cre-mediated excision of the third exon of *Ctnnb1* in all steroidogenic cells of the cortex resulted in adrenal hyperplasia and dysplasia, which progressed toward malignancy in a small subset of animals (11). Using a different genetic scheme relying on Sf-1-mediated deletion of *APC*, a key component of  $\beta$ -catenin destruction complex, Hammer's team (8) confirmed our observations, although tumor progression seemed slower in their model. These data showed that in contrast with IGF2, constitutive

active  $\beta$ -catenin had the potential to trigger tumor formation in the adrenal cortex, but that secondary events were required to trigger malignant transformation. Our 2 groups therefore tested the possible cooperation of WNT pathway activation and IGF2 overexpression that are found associated in the most aggressive ACC (reviewed in Ref. 15), by mating the different genetic models. In both studies, the combination of active  $\beta$ -catenin and elevated levels of *Igf2* accelerated tumor progression. However, to our surprise the acceleration was mild, even with an almost 30-fold increase in *Igf2* expression and over a 14-month time course. Indeed, we showed a significant switch of most 14-month-old tumors from a Weiss score of 0 with activation of  $\beta$ -catenin to 1 and 2 when the 2 alterations were combined. It was also associated with a mild but significant increase in the proliferation marker *Cyclin D1* and an overall increase in the number of adrenals with a Ki67-labeling index over the 5% malignancy threshold (7). The analysis of Heaton et al (8) yielded essentially the same observations, although their classification did not rely on Weiss scoring of the tumors. Strikingly, only one overt carcinoma in situ with a Weiss score of 3 was diagnosed in each of the 2 series (7, 8).

Taken together, these in vivo experiments demonstrate that isolated overexpression of *Igf2* has no oncogenic potential and strongly suggest that it is not a contributor to malignant tumor progression in the adrenal cortex, even when associated with  $\beta$ -catenin activation. This is in agreement with the observation that carcinomas with overexpression of *IGF2* are not transcriptionally distinct from carcinomas with low *IGF2* expression in whole-genome analyses (15). This strongly suggests that IGF2, as opposed to aberrant  $\beta$ -catenin activation, is not a driving force for the tumorigenic process in the adrenal cortex in both mouse and human.

Interestingly, a recent report showed that hypomethylation of *KCNQ1OT1* in the absence of other epigenetic alterations at the 11p15 locus was associated with sporadic pediatric adrenocortical tumors (16). This suggests that genes at the 11p15 locus other than *IGF2* could play a role in adrenal tumorigenesis. Clearly, future mouse models of adrenocortical tumorigenesis will have to take these alterations into account. This will help in determining whether IGF2 overexpression in ACC is a passenger hit, resulting from broad epigenetic alterations at 11p15 that target other potential tumor suppressors or oncogenes at the locus.

Eighteen years after its identification as an almost ubiquitous adrenocortical carcinoma marker, IGF2 has not held all of its promises. On the basis of the 2 recently published reports and bearing in mind the inherent limitations of mouse models, we think that IGF2 is not likely



to represent a good therapeutic target in the context of ACC. However, in light of the tremendous challenges that clinical management of ACC still represents, we hope that the outcome of the ongoing clinical trials will prove us wrong.

## Acknowledgments

We thank Dr. Antoine Martinez (Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6293, Génétique Reproduction et Développement, France) for critically reading this manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Pierre Val, Unité Mixte de Recherche 6293, Génétique Reproduction et Développement, 24 avenue des Landais, 63171 Aubière Cedex, France. E-mail: pierre.val@univ-bpclermont.fr.

Our research is supported by Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de La Santé et de la Recherche Médicale, Association pour la Recherche contre le Cancer (Grant SFI 20101201397), and La Ligue Régionale Contre le Cancer, Allier Committee.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

- Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, et al. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78:1444–1453.
- Ribeiro TC, Latronico AC. Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351:96–100.
- Else T. Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351:66–70.
- Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2001;61:6762–6767.
- Haluska P, Worden F, Olmos D, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65:765–773.
- Carden CP, Kim ES, Jones RL, et al. Phase I study of intermittent dosing of OSI-906, a dual tyrosine kinase inhibitor of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and insulin receptor (IR) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2010;28(suppl):2530.
- Drelon C, Berthon A, Ragazzon B, et al. Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS One*. 2012;7:e44171.
- Heaton JH, Wood MA, Kim AC, et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and  $\beta$ -catenin. *Am J Pathol*. 2012;181:1017–1033.
- Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2559–2565.
- Weber MM, Fottner C, Schmidt P, et al. Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. *Endocrinology*. 1999;140:1537–1543.
- Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, et al. Constitutive  $\beta$ -catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet*. 2010;19:1561–1576.
- Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351:87–95.
- Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E419–E426.
- Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, et al.  $\beta$ -Catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17:328–336.
- Assie G, Giordano TJ, Bertherat J. Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351:111–117.
- Wijnen M, Alders M, Zwaan CM, Wagner A, van den Heuvel-Eibrink MM. KCNQ1OT1 hypomethylation: a novel disguised genetic predisposition in sporadic pediatric adrenocortical tumors? *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(3):565–566.



Article 4 :

*WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosteroneproducing adenomas and controls aldosterone production.*

Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, Plateroti M, Lefèbvre H, Sahut-Barnola I, Batisse-Lignier M, Assié G, Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, Val P.

Hum Mol Genet. 2014 Feb



# WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production

Annabel Berthon<sup>1,2,3</sup>, Coralie Drelon<sup>1,2,3</sup>, Bruno Ragazzon<sup>4,5,†</sup>, Sheerazed Broulkroun<sup>6,7,†</sup>, Frédérique Tissier<sup>4,5,8,9</sup>, Laurence Amar<sup>6,7,10</sup>, Benoît Samson-Couterie<sup>6,7</sup>, Maria-Christina Zennaro<sup>6,7,11</sup>, Pierre-François Plouin<sup>6,7,10</sup>, Seham Skah<sup>12</sup>, Michelina Plateroti<sup>12</sup>, Hervé Lefèbvre<sup>13,14</sup>, Isabelle Sahut-Barnola<sup>1,2,3</sup>, Marie Batisse-Lignier<sup>1,2,3,15</sup>, Guillaume Assié<sup>4,5,16</sup>, Anne-Marie Lefrançois-Martinez<sup>1,2,3</sup>, Jérôme Bertherat<sup>4,5,16</sup>, Antoine Martinez<sup>1,2,3</sup> and Pierre Val<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France, <sup>2</sup>CNRS, UMR 6293, GReD, F-63001 Clermont-Ferrand, France, <sup>3</sup>Inserm, UMR 1103, GReD, F-63001 Clermont-Ferrand, France, <sup>4</sup>Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, F-75014, <sup>5</sup>Inserm, U1016, Paris, F-75014, <sup>6</sup>Institut National de la Santé et de la recherche médicale, UMRS\_970, Paris Cardiovascular Research Center, <sup>7</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, <sup>8</sup>Department of Pathology, Pitié-Salpêtrière Hospital, AP-HP, Pierre and Marie Curie University, <sup>9</sup>Department of Pathology, Cochin Hospital, AP-HP, Paris, France, <sup>10</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité Hypertension artérielle, Paris, France, <sup>11</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, Paris, France, <sup>12</sup>CNRS, UMR 5534, F-69622 Villeurbanne, <sup>13</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 982, and University of Rouen, F-76821 Mont-Saint Aignan, <sup>14</sup>University Hospital of Rouen, F-76031 Rouen, <sup>15</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, F-63000 and <sup>16</sup>Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Endocrinology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Paris, F-75014

Received July 26, 2013; Revised September 13, 2013; Accepted September 24, 2013

**Primary aldosteronism (PA) is the main cause of secondary hypertension, resulting from adrenal aldosterone-producing adenomas (APA) or bilateral hyperplasia. Here, we show that constitutive activation of WNT/ $\beta$ -catenin signalling is the most frequent molecular alteration found in 70% of APA. We provide evidence that decreased expression of the WNT inhibitor *SFRP2* may be contributing to deregulated WNT signalling and APA development in patients. This is supported by the demonstration that mice with genetic ablation of *Sfrp2* have increased aldosterone production and ectopic differentiation of zona glomerulosa cells. We further show that  $\beta$ -catenin plays an essential role in the control of basal and Angiotensin II-induced aldosterone secretion, by activating *AT1R*, *CYP21* and *CYP11B2* transcription. This relies on both LEF/TCF-dependent activation of *AT1R* and *CYP21* regulatory regions and indirect activation of *CYP21* and *CYP11B2* promoters, through increased expression of the nuclear receptors NURR1 and NUR77. Altogether, these data show that aberrant WNT/ $\beta$ -catenin activation is associated with APA development and suggest that WNT pathway may be a good therapeutic target in PA.**

## INTRODUCTION

Adrenal autonomous secretion of aldosterone also called primary aldosteronism (PA) is the main cause of secondary

hypertension with a prevalence of 6–13% of hypertensive patients (1,2). In 95% of the cases, this pathology is caused by adrenal aldosterone-producing adenomas (APA) or bilateral hyperplasia (3). Clinical management of PA essentially relies

\*To whom correspondence should be addressed at: Pierre VAL, CNRS UMR 6293 GReD, 24 avenue des Landais, 63171 Aubière Cedex, France. Tel: + 33 473407412; Fax: +33 473407042; Email: pierre.val@univ-bpclermont.fr

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the third and fourth authors should be regarded as joint third authors.





on surgical resection and/or treatment with mineralocorticoids antagonists to minimize hypertension (4,5). However, complete normalization of blood pressure is rarely achieved and mineralocorticoids antagonists are associated with adverse endocrine side effects (6). Although new promising treatments such as aldosterone synthase inhibitors are emerging (7,8), identification of the molecular aetiology of PA is essential to allow the development of more specific and more efficient drugs. Multiple molecular alterations such as down-regulation of TASK channels (9,10) or circadian clock deregulation (11) have been proposed to play a role in the establishment of PA but their clinical relevance is still unclear. Recent data suggest that the development of a subset of APA is associated with mutations in the *KCNJ5* gene, which cause dysfunction of the Kir3.4 potassium channel, or mutations in the genes encoding the ATPases ATP1A1 and ATP2B3 (12–16). In both cases, these alterations result in inappropriate membrane depolarization, which increases steroidogenic capacities of adrenocortical cells. Even though *KCNJ5* and ATPases mutations account for ~40–45% of patients with sporadic PA, the molecular mechanisms underlying the majority of APA still remain elusive (13,15,16,17,18).

We have recently shown that transgenic mice with specific constitutive activation of  $\beta$ -catenin in the adrenal cortex presented with increased aldosterone production (19). Here, we have investigated the hypothesis that aberrant WNT pathway activation may play a role in the development of APA in patients.

## RESULTS

### WNT/ $\beta$ -catenin pathway is constitutively activated in APA

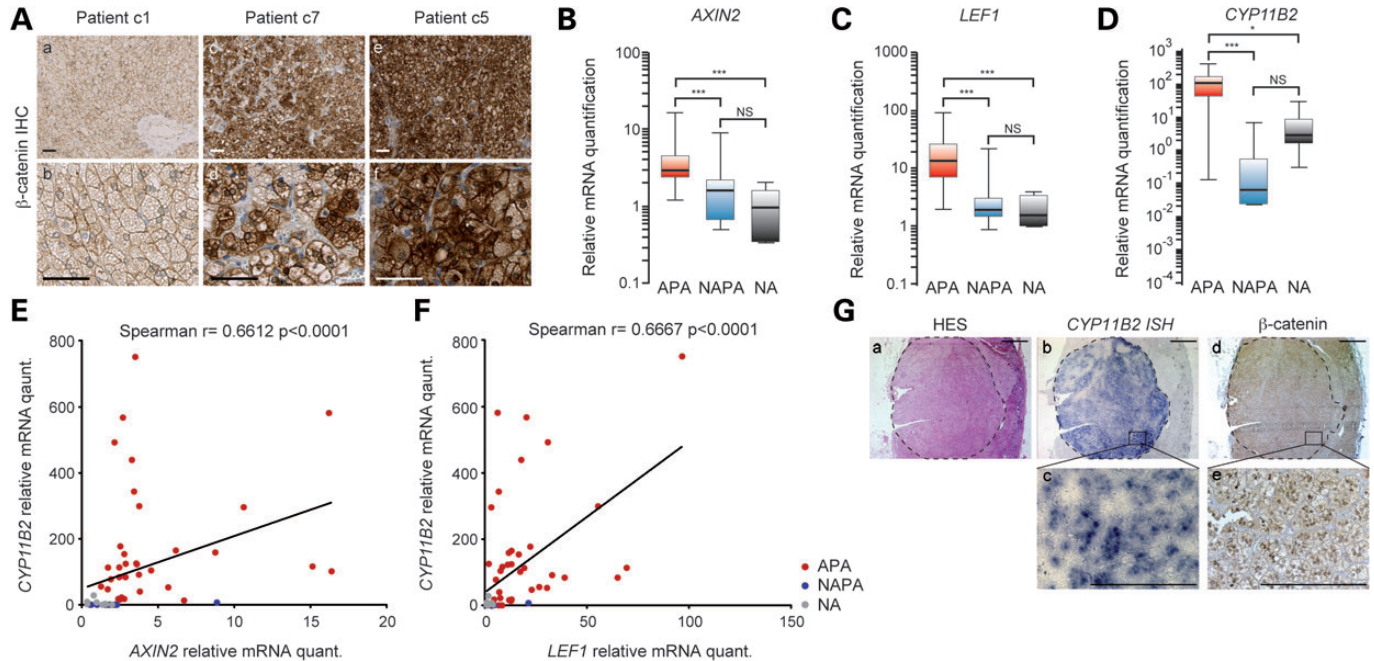
To evaluate the potential role of WNT pathway in the development of APA, we analysed the status of WNT/ $\beta$ -catenin pathway activation in tissue samples from 47 patients diagnosed with PA caused by adrenal APA. Patients' clinical and biological characteristics are described in Supplementary Material, Table S1A. Immunohistochemistry for  $\beta$ -catenin showed cytoplasmic (Fig. 1Ac and d) and/or nuclear (Fig. 1Ae and f) accumulation of  $\beta$ -catenin in 33/47 APA (Supplementary Material, Table S1B). This suggested that WNT/ $\beta$ -catenin signalling was activated in 70% of APA in our series (Fig. 1A and Supplementary Material, Table S1B). To confirm these observations, WNT/ $\beta$ -catenin pathway target genes expression was analysed by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR) in 35 out of the 47 APA that were analysed by immunohistochemistry (Supplementary Material, Table S1B). In these experiments, APA were compared with 7 normal adrenals (NA) and 17 non-aldosterone-producing adenomas (NAPA) that were selected on the basis of cortisol or androgen secretion and absence of histological signs of  $\beta$ -catenin activation. These experiments demonstrated a significant overexpression of *AXIN2* (Fig. 1B) and *LEF1* (Fig. 1C) in APA compared with both NA and NAPA. We then analysed expression of *CYP11B2* (Fig. 1D) and performed correlation analyses with *AXIN2* and *LEF1* expression levels. These experiments showed a strong association between *AXIN2* (Fig. 1E), *LEF1* (Fig. 1F) and *CYP11B2* expression levels. To further strengthen our hypothesis of an association between WNT activation and *CYP11B2* overexpression, we analysed expression of *CYP11B2* (by *in situ* hybridization) and  $\beta$ -catenin (by

immunohistochemistry) on consecutive sections of APA. These data showed that cells within the adenoma displayed both high levels of *CYP11B2* expression (Fig. 1Gb and c) and nuclear  $\beta$ -catenin staining (Fig. 1Gd and e). We therefore concluded that canonical WNT/ $\beta$ -catenin signalling was activated in a majority of APA and that this activation was correlated with increased *CYP11B2* expression.

### WNT/ $\beta$ -catenin pathway activation in APA is associated with down-regulation of *SFRP2*

WNT/ $\beta$ -catenin pathway activation in adrenal tumours has mostly been attributed to activating mutations in the *CTNNB1* gene (20). However, there were no such mutations in our series of 26  $\beta$ -catenin-positive APA for which genomic DNA was available (Supplementary Material, Table S1B). This result was in agreement with a recent report showing no activating *CTNNB1* mutations in 41 APA (21). We then evaluated the possibility of an association between WNT pathway activation and *KCNJ5* mutations. Out of the 19  $\beta$ -catenin-positive tumours that were available for sequencing, 9 were mutant for *KCNJ5* (47%). However, 6/9 (67%) of the  $\beta$ -catenin-negative tumours were also mutant for *KCNJ5* (Supplementary Material, Table S1B). This suggested that there was no association between *KCNJ5* mutations and canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway activation in APA. In an attempt to identify WNT regulators that may be relevant to APA development, we compared expression levels of known WNT regulators (based on a compilation of data available from the Wnt Homepage and PubMed browsing) in six APA and four NA by retrospective analysis of cDNA microarray data ((22), Supplementary Material, Fig. S1). This analysis confirmed significant up-regulation of *AXIN2* and *LEF1* expression in APA, but surprisingly failed to identify up-regulation of positive regulators of WNT pathway activity, with the exception of Lrp6 WNT coreceptor (Supplementary Material, Fig. S1). However, this approach showed significant down-regulation of *SFRP1*, 2 and 4, three members of the SFRP (secreted frizzled related protein) family of WNT signalling inhibitors, in APA. These factors have the ability to bind and titrate WNT ligands and their down-regulation has been shown to stimulate WNT pathway activation in tumours (23). To further confirm our transcriptome data, we analysed expression of *SFRP1*, *SFRP2* and *SFRP4* by RTqPCR in our series of 35 APA in comparison with NAPA and NA. We reasoned that factors relevant to WNT pathway activation and aldosterone production should be deregulated in APA in comparison with both NA and NAPA. In these experiments, *SFRP1* was down-regulated in APA and NAPA compared with NA (Fig. 2A). However, there was no significant difference in *SFRP1* expression in APA compared with NAPA, suggesting that it was not involved in the establishment of the aldosterone-producing phenotype. In contrast with the microarray data, RTqPCR analyses of our larger series did not show down-regulation of *SFRP4* in APA compared with NA and even showed up-regulation in comparison with NAPA (Fig. 2B). Interestingly, *SFRP2* expression was significantly downregulated in APA compared with both NA and NAPA (Fig. 2C). This suggested that it could be involved in the establishment of deregulated WNT signalling and subsequent aldosteronism in APA patients. Consistent with this idea, *SFRP2*





**Figure 1.** WNT/ $\beta$ -catenin pathway is activated in Conn's syndrome patients. (A) Nucleo-cytoplasmic accumulation of  $\beta$ -catenin in APA. Immunohistochemistry shows cytoplasmic (e.g. patient #c7) or nucleocytoplasmic (e.g. patient #c5) accumulation of  $\beta$ -catenin in 33 out of 47 APA and wild-type membrane-associated staining in 14 out of 47 APA (e.g. patient #c1). Scale bar is 200  $\mu$ m. (B and C) Two  $\beta$ -catenin target genes, *AXIN2* and *LEF1* are up-regulated in APA. *AXIN2* and *LEF1* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from 35 APA, 17 NAPA and 7 NA. (D) *CYP11B2* is up-regulated in aldosterone-producing tumours. Aldosterone synthase *CYP11B2* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from APA, NAPA and NA. (E and F) *AXIN2* and *LEF1* expression levels are correlated with *CYP11B2* expression. RTqPCR data were used to correlate WNT pathway activation (*AXIN2* and *LEF1*) with *CYP11B2* expression in a Spearman correlation analysis. (G) *CYP11B2* and nuclear  $\beta$ -catenin are expressed in similar areas of APA. *CYP11B2* (*in situ* hybridization, b and c) and  $\beta$ -catenin (immunohistochemistry, d and e) were detected in consecutive sections from APA. Haematoxylin-eosin-safran (HES) staining shows the structure of the adenoma within the adrenal cortex (a), delimited by a dashed line. Scale bar is 200  $\mu$ m in a, b and d and 50  $\mu$ m in c and e. Statistical analyses in (B)–(D) were performed by non-parametric ANOVA (Kruskal–Wallis) followed by Dunn's *post hoc* test. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.0005$ .

expression was inversely correlated with both *AXIN2* (Supplementary Material, Fig. S2A) and *CYP11B2* expression (Fig. 2D).

### *Sfrp2* knockout mice have increased Wnt signalling and aldosterone production

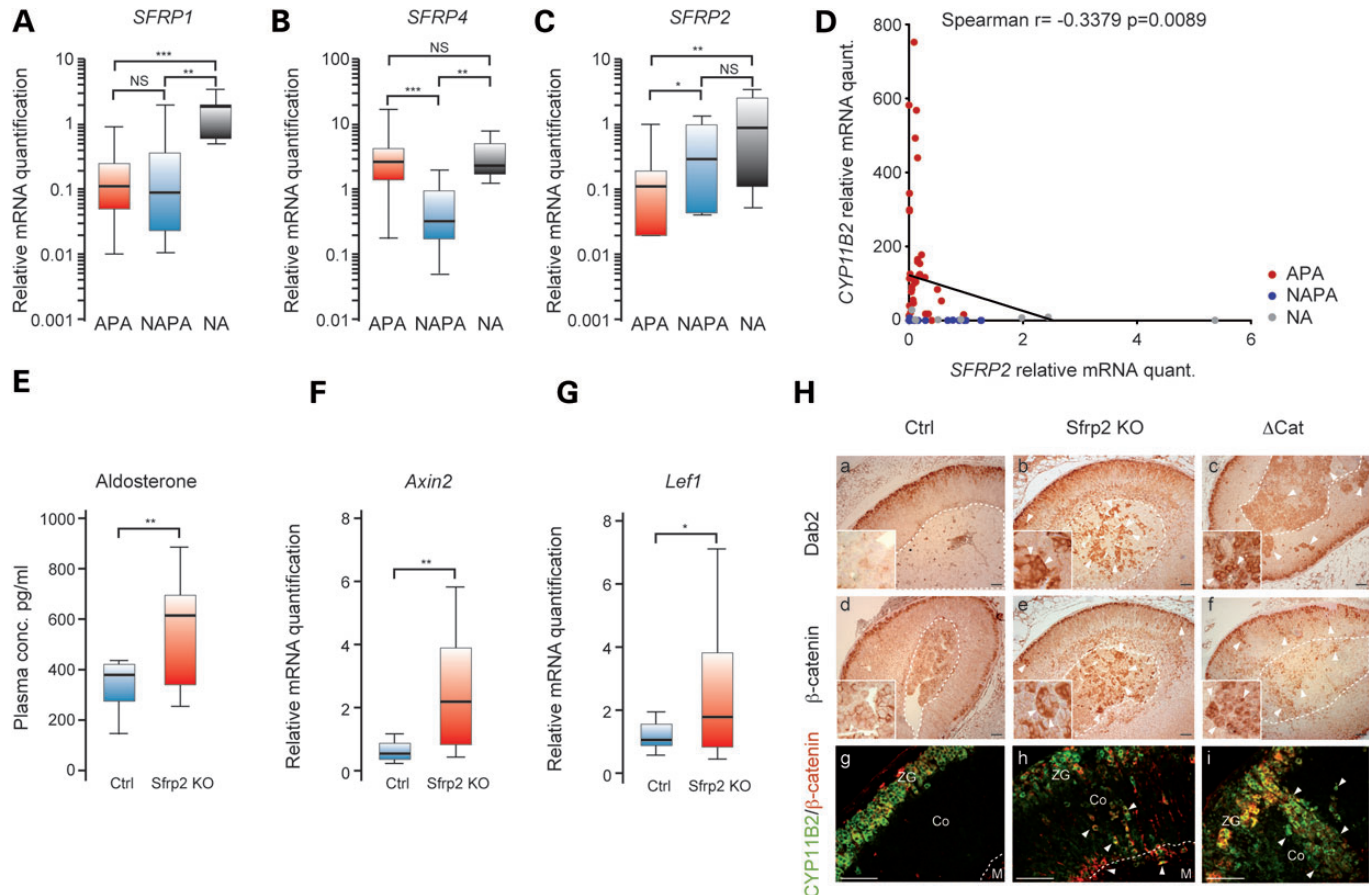
To further explore a link between *SFRP2* down-regulation and APA development, we analysed plasma aldosterone concentrations in *Sfrp2* knockout mice. These mice are characterized by brachy-syndactyly, but their adrenal function was never investigated (24). Individual increases in plasma aldosterone were observed as early as 7 months in homozygous mutant females; however, significant overall increases were only observed in 12- to 13-month-old mutants compared with wild-type littermates (Fig. 2E). These were independent of renin, which was not significantly elevated in *Sfrp2* knockout mice ( $3.77 \pm 2.88$  mUI/l) compared to wild-type mice ( $2.38 \pm 1.29$  mUI/l). The hormonal phenotype was specific of aldosterone, as corticosterone levels were not significantly altered by *Sfrp2* knockout (Supplementary Material, Fig. S2B). Consistent with a role of *Sfrp2* in restraining Wnt signalling in the adrenal, mRNA accumulation of *Axin2* (Fig. 2F) and *Lef1* (Fig. 2G) was increased in *Sfrp2*<sup>-/-</sup> adrenals. Interestingly, plasma aldosterone concentration was significantly correlated with *Axin2* mRNA accumulation (Spearman  $r = 0.4834$ ,  $P = 0.0167$ ). We further confirmed these observations by immunohistochemical analysis of Dab2 (a molecular marker of zona-glomerulosa differentiation (25)),  $\beta$ -catenin and

*Cyp11b2* expression. Consistent with the endocrine and molecular phenotypes, immunohistological analysis of *Sfrp2* knockout adrenals showed ectopic Dab2 (Fig. 2Hb versus a) and  $\beta$ -catenin-positive cells (Fig. 2He versus d) within the adrenal cortex and central adrenal region. These ectopic cells were also positive for *Cyp11b2* (Fig. 2Hh versus g; Supplementary Material, Fig. S2C), which was reminiscent of the phenotype of  $\Delta$ Cat mice with adrenal-specific constitutive  $\beta$ -catenin activation (Fig. 2Hc, f and i (19)). This showed that *Sfrp2* knockout was sufficient to increase adrenal Wnt signalling and aldosterone secretion. We thus concluded that down-regulation of *SFRP2* expression was one of the possible causes for deregulation of WNT signalling and development of APA in patients.

### $\beta$ -Catenin controls aldosterone production at multiple levels

In order to understand the role of  $\beta$ -catenin in aldosterone production, we used the human adrenocortical cell line H295R that has the ability to produce aldosterone in response to its natural secretagogue, Angiotensin II. However, it spontaneously expresses a constitutive active mutant form of  $\beta$ -catenin (S45A mutation) (26). We therefore decided to down-regulate  $\beta$ -catenin activity and to assess basal and Angiotensin II-induced aldosterone production. Transfection of H295R cells with small interfering RNAs to  $\beta$ -catenin induced a mean 60% decrease in  $\beta$ -catenin expression compared with unrelated GFP siRNA (Supplementary Material,





**Figure 2.** Down-regulation of *SFRP2* expression is associated with WNT pathway activation and aldosteronism. (A–C) *SFRP2* is down-regulated in APA. The expression of three members of the secreted frizzled related protein (SFRP), *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* was analysed by RTqPCR on mRNAs from 35 APA, 17 NAPA and 7 NA. (D) *SFRP2* and *CYP11B2* expression levels are inversely correlated. RTqPCR data were used to correlate *SFRP2* with *CYP11B2* expression in a Spearman correlation analysis. (E) *Sfrp2* knockout is associated with increased aldosterone production. Plasma aldosterone concentrations were measured in female control (Ctrl, *Sfrp2*<sup>+/+</sup> and *Sfrp2*<sup>-/-</sup>) and female homozygous *Sfrp2* knockout mice (*Sfrp2* KO, *Sfrp2*<sup>-/-</sup>) at 13 months. Boxplots represent the quantification of aldosterone production in 11 female control and 13 littermate female knockout mice. (F and G) Wnt signalling is increased in the adrenals of *Sfrp2* knockout mice. *Axin2* (F) and *Lef1* (G) expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from control and homozygous *Sfrp2* knockout mice. Boxplots represent the relative quantification of gene expression in 11 female control and 13 female knockout mice. (H) Genetic ablation of *Sfrp2* results in aberrant activation of  $\beta$ -catenin and ectopic differentiation of zona-glomerulosa cells. Expression of Dab2 (a–c)  $\beta$ -catenin (d–f) and co-expression of  $\beta$ -catenin (red) and Cyp11b2 (green, g–i) was analysed by immunohistochemistry in wild-type (*Sfrp2*<sup>+/+</sup>), *Sfrp2* knockout (*Sfrp2*<sup>-/-</sup>) and  $\Delta$ Cat mice (19). Insets were taken from the central adrenal regions, highlighted by dashed white lines. White arrowheads show ectopic Cyp11b2, Dab2 and  $\beta$ -catenin-positive cells. Dashed lines show the boundaries between cortex and medulla. ZG, zona glomerulosa; Co, cortex; M, medulla. Scale bar is 80  $\mu$ m. Statistical analyses in (A)–(C) were performed by non-parametric ANOVA (Kruskal–Wallis) followed by Dunn's *post hoc* test. Statistical analyses in (E)–(G) were performed by Welch's *t*-test, to account for different variances between groups. Similar results were obtained by Mann–Whitney analyses \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.005; \*\*\**P* < 0.0005; NS, not significant.

Fig. S3A and B). As expected, this resulted in a significant down-regulation of *AXIN2* (Supplementary Material, Fig. S3C) and *LEF1* (Supplementary Material, Fig. S3D) target gene expression. Interestingly, down-regulation of  $\beta$ -catenin also resulted in a marked decrease in basal aldosterone output and completely abrogated response to Angiotensin II (Fig. 3A). In order to confirm these observations, we treated H295R cells with PKF115-584, a previously published inhibitor of  $\beta$ -catenin transcriptional activity (27). As expected, treatment with PKF115-584 induced a dose-dependent decrease in the expression of *AXIN2* (Supplementary Material, Fig. S3E) and *LEF1* (Supplementary Material, Fig. S3F). Consistent with our siRNA data, this treatment also induced a dose-dependent decrease in basal aldosterone production and markedly reduced Angiotensin II responsiveness at the

highest dose (Fig. 3B). We thus concluded that  $\beta$ -catenin was required for basal aldosterone production and that it was essential to mediate Angiotensin II response in H295R cells. To identify relevant  $\beta$ -catenin target genes involved in the control of aldosterone production, we analysed expression of all the genes coding proteins involved in aldosterone synthesis and of the Angiotensin II Type I receptor *AT1R*, by RTqPCR (Fig. 3C). Treatment with  $\beta$ -catenin siRNAs resulted in a decrease in Angiotensin II-induced mRNA accumulation of *CYP11B2* (Fig. 3D) and *CYP21* (Fig. 3E) and inhibition of basal expression of *AT1R* (Fig. 3F). Similar results were obtained in cells treated with PKF115-584 (Fig. 3G–I). In contrast,  $\beta$ -catenin siRNAs had no significant effect on the expression of *StAR*, *CYP11A1*, *HSD3B2* and *CYP11B1* (Supplementary Material, Fig. S3G–J).





To further support these observations, we decided to perform experiments in which  $\beta$ -catenin activity was stimulated using BIO, a known inhibitor of GSK3 $\beta$ . Unfortunately, the presence of a constitutive active allele of  $\beta$ -catenin prevented further activation of WNT signalling in H295R cells (data not shown). We thus made use of mouse Y1 adrenocortical cells that express a wild-type version of  $\beta$ -catenin but do not produce aldosterone. As expected, treatment with BIO induced a time-dependent increase in *Axin2* transcription (Supplementary Material, Fig. S3K and L),  $\beta$ -catenin accumulation (Supplementary Material, Fig. S3M) and TOP-FLASH activity in transient transfection experiments (Supplementary Material, Fig. S3N). This was associated with a significant increase in *Cyp11b2* and *Cyp21* expression after 3 and 6 h of treatment (Fig. 3J and K). Increased expression of *Cyp11b2* (Fig. 3L) and *Cyp21* (Fig. 3M) was also observed in the adrenals of 10-month-old  $\Delta$ Cat mice, our model of constitutive  $\beta$ -catenin activation (19). Although we could not detect *At1r* expression in Y1 cells even in the presence of BIO, we observed overexpression of both murine isoforms of *At1r* (*At1a* and *At1b*) in  $\Delta$ Cat adrenals (Fig. 3N). Altogether, these data showed that  $\beta$ -catenin controlled aldosterone production by stimulating the expression of three actors that play an essential role in its synthesis.

### $\beta$ -Catenin controls CYP11B2 expression indirectly

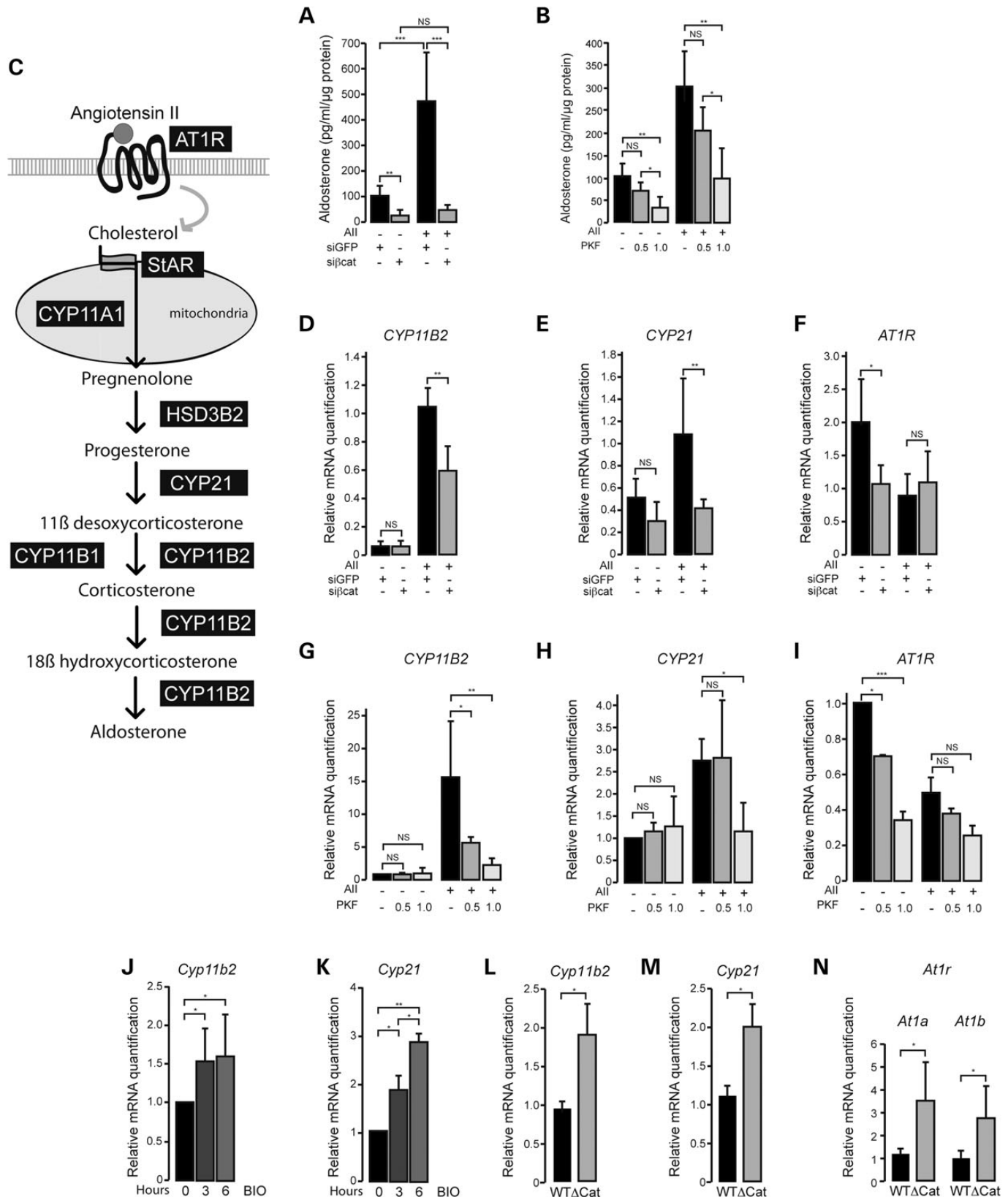
CYP11B2 is the terminal and one of the rate-limiting enzymes for aldosterone synthesis.  $\beta$ -Catenin mostly acts as a transcription coactivator by interacting with transcription factors such as LEF/TCF. We thus evaluated the possibility that  $\beta$ -catenin-controlled CYP11B2 expression at the transcriptional level. For this, Y1 cells were treated with BIO in the presence or absence of actinomycin D, an inhibitor of transcription. RTqPCR analysis showed that induction of *Cyp11b2* expression by BIO was completely abrogated by actinomycin D, suggesting that  $\beta$ -catenin stimulated the transcription of *Cyp11b2* (Fig. 4A). Computer-assisted analysis of human CYP11B2 regulatory regions identified two putative LEF/TCF-binding sites at  $-768/-774$  and  $-1266/-1273$  (Fig. 4B; Supplementary Material, Fig. S4). To assess the role of these putative sites in CYP11B2 promoter activity, we transfected wild-type or mutated constructs of CYP11B2 regulatory regions in H295R cells (Fig. 4B). As previously published (28), the wild-type promoter drove luciferase expression in H295R cells and strongly responded to Angiotensin II stimulation (Fig. 4C, WT). Surprisingly, mutation of both putative LEF1-binding sites (Fig. 4B) had no effect on basal promoter activity or on Angiotensin II responsiveness (Fig. 4C, Lef mut), suggesting that  $\beta$ -catenin was not acting on CYP11B2 promoter regions through interaction with LEF/TCF-binding sites. The nuclear receptors NURR1 (NR4A2) and NUR77 (NR4A1) are essential regulators of CYP11B2 expression in the adrenal (28). We thus evaluated the effect of the three previously published NUR-binding sites on CYP11B2 promoter activity and on its ability to respond to  $\beta$ -catenin. Treatment of H295R cells with the WNT antagonist PKF115-584 inhibited both basal and Angiotensin II-induced CYP11B2 promoter activity, confirming that the effect of  $\beta$ -catenin on CYP11B2 expression was essentially transcriptional (Fig. 4D, WT). Mutation of the three NUR-binding sites (NBRE, Ad1, Ad5, Fig. 4B) led to decreased but still measurable levels of promoter activity (Fig. 4D, NBRE/Ad mut). This mutation

abrogated promoter response to Angiotensin II and interestingly, it also prevented PKF115-584-mediated repression of promoter activity (Fig. 4D, NBRE/Ad mut). This suggested that the effect of  $\beta$ -catenin on CYP11B2 regulatory regions was mediated by nuclear receptors of the NUR family.

We initially hypothesized that  $\beta$ -catenin could work as a coactivator of NUR transcriptional activity. However, our repeated transfection experiments failed to provide support for such a theory (data not shown). Therefore, we hypothesized a role of  $\beta$ -catenin in controlling expression of NURs. Indeed,  $\beta$ -catenin knockdown resulted in a significant decrease in *NURR1* (Fig. 5A) and *NUR77* (Fig. 5B) basal and Angiotensin II-induced expression at the mRNA (Fig. 5A and B) and protein level (Fig. 5A and B; Supplementary Material, Fig. S3O and P) in H295R cells. This decrease was also observed in response to PKF115-584 treatment (Supplementary Material, Fig. S3Q and R). Conversely, expression of both nuclear receptors was significantly induced by BIO in Y1 cells (Fig. 5C and D). In agreement with these *in vitro* data, mRNAs for *Nurr1* (Fig. 5E) and *Nur77* (Fig. 5F) were markedly accumulated in 10-month-old  $\Delta$ Cat adrenals. This was further supported by increased expression of *NURR1* in APA compared with NAPA (Fig. 5G). To further analyse the mechanism involving  $\beta$ -catenin in NUR induction, we treated Y1 cells with both BIO and actinomycin D. Actinomycin D abrogated induction of *Nurr1* and *Nur77* mRNA accumulation by BIO (Fig. 5I and J), suggesting that  $\beta$ -catenin acted by stimulating transcription from *Nurr1* and *Nur77* promoters. Sequence analysis of *NURR1* regulatory regions identified two putative Lef/Tcf-binding sites at  $-57/-61$  and  $+67/+71$  that were conserved in mouse and human (Supplementary Material, Fig. S5). Such binding sites were not identified in *NUR77* regulatory regions. However, a recent publication showed that  $\beta$ -catenin could stimulate human *NUR77* expression *in vitro* by associating with c-Jun/c-Fos proteins at four AP1-binding sites ( $-3/+4$ ,  $-26/-32$ ,  $-169/-175$  and  $-189/-195$ ) that were conserved in mouse and human (29) (Supplementary Material, Fig. S6). To confirm binding of  $\beta$ -catenin to these regulatory regions, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in H295R cells.  $\beta$ -Catenin bound to both *NURR1* (through LEF/TCF sites) and *NUR77* (through AP1 sites) promoters in untreated cells (Fig. 5K and L). Consistent with our expression analysis data, binding of  $\beta$ -catenin was markedly diminished after incubation with PKF115-584 (Fig. 5K and L). To further confirm these observations, we performed similar ChIP experiments with whole adrenal glands from wild-type or  $\Delta$ Cat mice that overexpress both *Nurr1* and *Nur77* (Fig. 5M and N). Binding of  $\beta$ -catenin to Lef/Tcf or AP1 sites was almost undetectable in wild-type adrenals. However, it was markedly increased in  $\Delta$ Cat adrenals, in which  $\beta$ -catenin was constitutively activated (Fig. 5M and N). Altogether, these experiments showed that  $\beta$ -catenin could control expression of both nuclear receptors *in vitro* and *in vivo*. It further suggested that the effect of  $\beta$ -catenin on CYP11B2 expression could be mediated by NURR1 and NUR77. To confirm this hypothesis, NUR binding to CYP11B2 promoter regions was analysed by *in vitro* and *in vivo* ChIP experiments. In H295R cells, NURR1 and NUR77 bound to the proximal Ad1 and Ad5 sequences (Fig. 5O, top panel) and to a lesser extent to the distal NBRE sequence (Fig. 5O, bottom panel). In both cases, NUR binding was inhibited by the Wnt inhibitor PKF115-584 (Fig. 5O). Although the NUR response elements previously

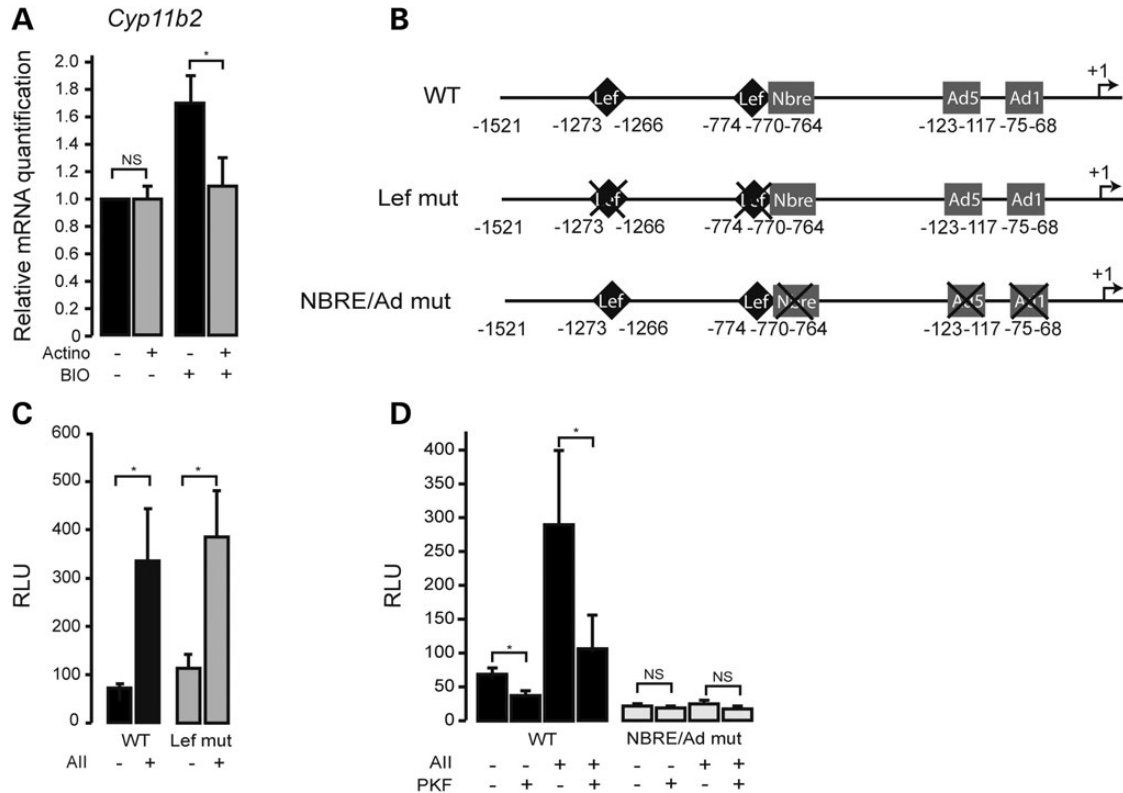






**Figure 3.** Wnt/ $\beta$ -catenin pathway controls aldosterone secretion. (A)  $\beta$ -Catenin knockdown decreases aldosterone secretion. Basal and Angiotensin II-induced aldosterone concentrations were measured on the culture medium of H295R cells that were either transfected with a control siRNA (siGFP) or transfected with a siRNA to  $\beta$ -catenin (si $\beta$ cat) for 5 days and treated 6 h before harvesting with or without 10 nM Angiotensin II. (B) Inhibition of the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin decreases aldosterone secretion. Aldosterone concentrations were measured in the medium of H295R cells that were pre-treated for 24 h with DMSO





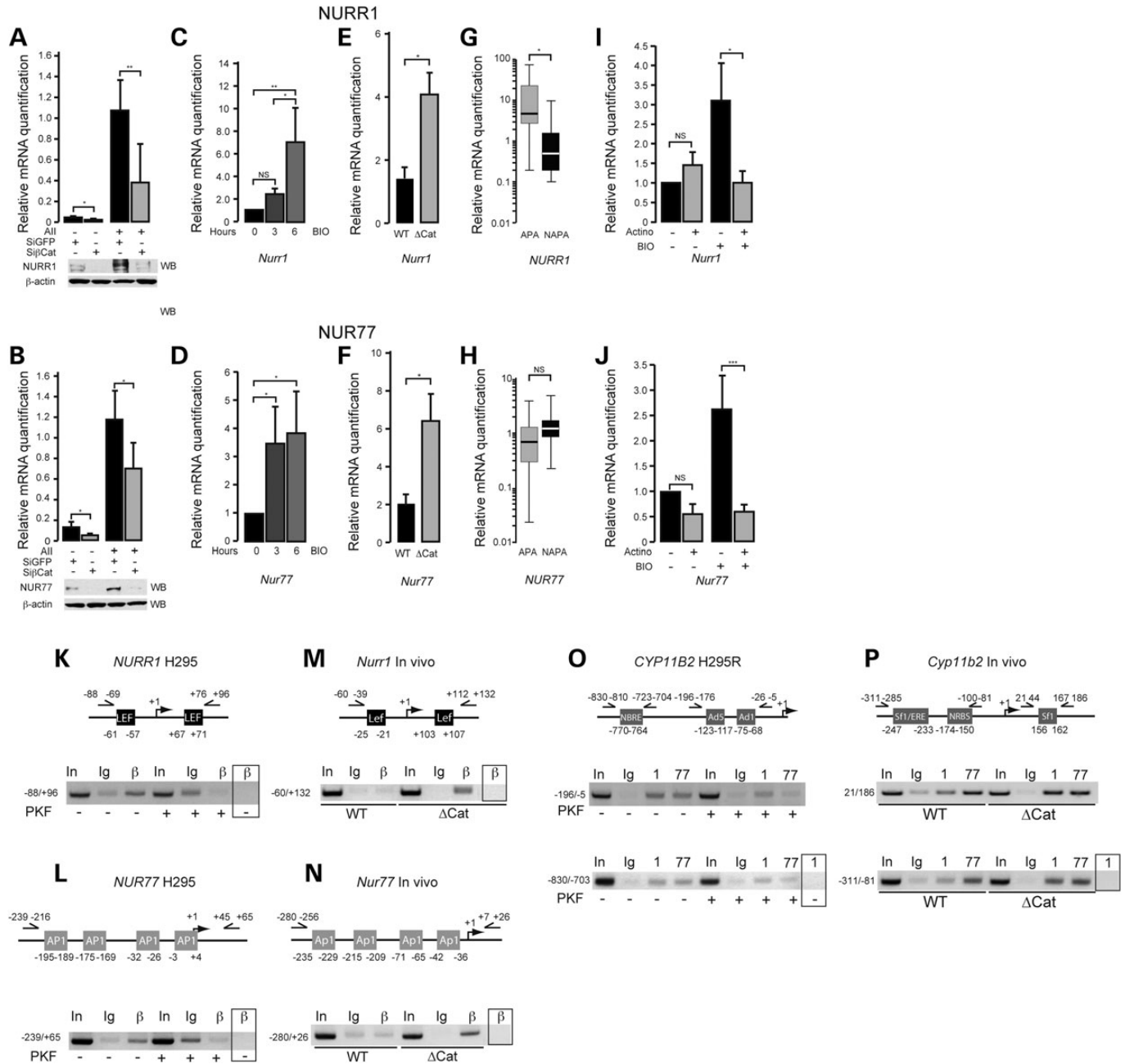
**Figure 4.**  $\beta$ -Catenin regulates transcription of *CYP11B2* independently of LEF/TCF-binding sites. (A) Wnt/ $\beta$ -catenin activation induces transcription of *Cyp11b2*. *Cyp11b2* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from Y1 cells stimulated by DMSO (control group) or 500 nM BIO alone or in combination with 100 nM actinomycin D (transcription inhibitor) for 6 h before harvesting. (B) Schematic representation of human *CYP11B2* promoter. WT plasmid encompasses 1521 bp of wild-type human *CYP11B2* promoter regions upstream of the luciferase reporter gene (WT). In Lef Mut plasmid two putative LEF/TCF sites (–768/–774, –1266/–1273) predicted by *in silico* analysis were mutated. In the NBRE/Ad mut plasmid, one NBRE (–764/–770) and two Ad sites (–68/–75, –117/–123) that were previously shown to bind NGF1B nuclear receptors were mutated. (C) Mutagenesis of LEF/TCF sites does not alter *CYP11B2* basal and Angiotensin II-stimulated promoter activity. H295R cells were transfected for 24 h with WT or Lef mut plasmid and stimulated for 6 h with 10 nM Angiotensin II before relative luciferase activity (RLU) was quantified in protein extracts. Bars represent the mean relative quantification of at least 3 individual experiments  $\pm$  standard deviation. (D) Mutagenesis of NBRE and Ad sites abolishes *CYP11B2* induction by Angiotensin II and prevents repression by PKF-115-584. Relative luciferase activity (RLU) was measured in H295R cells transfected with WT or NBRE/Ad mut plasmids for 16 h. They were then pre-treated for 24 h with DMSO (control group) or 1.0  $\mu$ M PKF115-584 and treated for 6 h with either 1.0  $\mu$ M PKF115-584 or 10 nM Angiotensin II alone or a combination of both. Bars in (A) represent the mean relative quantification of at least four individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. Bars in (C) and (D) represent the mean RLU value of at least three individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test. \* $P < 0.05$ ; NS, not significant.

described in human *CYP11B2* regulatory regions were not strictly conserved in mouse *Cyp11b2* regulatory regions, sequence analysis identified a putative Sf-1 response element (+156/+162, also known to bind Nur proteins) downstream of the TSS

(transcription start site) and two potential nuclear receptor-binding sites (–174/–150, –233/–247) upstream of the TSS (Supplementary Material, Fig. S4). *In vivo* ChIP experiments showed mild binding of both Nurr1 and Nur77 to the proximal

(control group), 0.5 or 1.0  $\mu$ M PKF115-584 (Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor) followed by Angiotensin II stimulation alone or in combination with PKF115-584 for 6 h before harvesting. (C) Schematic representation of aldosterone biosynthesis pathway. AT1R, Angiotensin II Type 1 Receptor; StAR, steroidogenic acute regulatory; CYP11A1, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage; HSD3B2, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; CYP21, cytochrome P450 21-hydroxylase; CYP11B1, cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase; CYP11B2, cytochrome P450 aldosterone synthase. (D–F)  $\beta$ -Catenin knockdown decreases basal *AT1R* expression and Angiotensin II-induced *CYP11B2* and *CYP21* expression. *AT1R*, *CYP21* and *CYP11B2* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from H295R cells transfected with a control siRNA (siGFP) or a siRNA to  $\beta$ -catenin (si $\beta$ cat) in basal condition or after 6 h 10 nM Angiotensin II treatment. (G–I) Inhibition of the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin down-regulates *CYP11B2*, *CYP21* and *AT1R* expression. *AT1R*, *CYP21* and *CYP11B2* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNA from H295R cells that were pre-treated for 24 h with DMSO (control group), 0.5 or 1.0  $\mu$ M PKF115-584 followed by 10 nM Angiotensin II stimulation alone or in combination with PKF115-584 for 6 h, before harvesting. (J and K) *Cyp11b2* and *Cyp21* are up-regulated by activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Cyp11b2* and *Cyp21* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from the mouse Y1 adrenocortical cells that were induced with DMSO (control group) or 500 nM BIO, an activator of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling for 3 or 6 h. (L–N) *Cyp11b2*, *Cyp21* and *At1r* expression levels are increased in the adrenals of mice with constitutive  $\beta$ -catenin activation. Expression of *Cyp11b2*, *Cyp21* and the two mouse *At1r* genes (*At1a* and *At1b*) was analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from 10-month-old wild-type ( $n = 6$ ) and  $\Delta$ Cat ( $n = 6$ ) mice. Bars in (A) and (B) represent the mean aldosterone concentration in culture medium (normalized to protein content) from at least four individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. Bars in (D)–(K) represent the mean quantification of at least four individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. Bars in (L)–(N) represent the mean relative quantification ( $n = 6$ )  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses in (A)–(K) were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Statistical analyses in (L)–(N) were conducted by Student's *t*-test. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; NS, not significant.





**Figure 5.** β-Catenin controls *CYP11B2* transcription through stimulation of *NGFIB* nuclear receptors expression. (A and B) β-catenin knockdown decreases *NURR1* and *NUR77* expression. *NURR1* and *NUR77* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs and by western blot on proteins extracts (bottom panels) from H295R transfected for 5 days with control siRNA (siGFP) or a siRNA to β-catenin (siβcat) and treated for 6 h with 10 nM Angiotensin II. (C and D) Wnt/β-catenin activation induces *Nurr1* and *Nur77* expression. *Nurr1* and *Nur77* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNA from Y1 cells that were treated with DMSO (control group) or 500 nM of BIO for 3 or 6 h. (E and F) *Nurr1* and *Nur77* expression levels are increased in the adrenals of mice with constitutive β-catenin activation. Expression of *Nurr1* and *Nur77* was analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from 10-month-old wild-type ( $n = 6$ ) and ΔCat ( $n = 6$ ) mice. (G and H) *NURR1* expression is up-regulated in APA. *NURR1* and *NUR77* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from 35 APA and 17 NAPA. (I and J) β-Catenin stimulates transcription of *Nurr1* and *Nur77*. *Nurr1* and *Nur77* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from Y1 cells stimulated by DMSO (control group) or 500 nM BIO alone or in combination with 100 nM actinomycin D for 6 h. (K and L) β-Catenin binding to *NURR1* and *NUR77* regulatory regions is inhibited by PKF115-584 in H295R cells. H295R cells were treated with DMSO (control group) or 1.0 μM PKF115-584 for 30 h. After treatment, cells were fixed and sheared chromatin was immunoprecipitated with 5 μg of a control immunoglobulin (Ig) or 5 μg of an antibody to β-catenin (β). PCRs were performed with primers (arrows) flanking two conserved putative LEF/TCF-binding sites in *NURR1* regulatory regions (K) and four previously described AP1-binding sites in *NUR77* promoter (L). Boxed lanes represent control immunoprecipitation experiments performed with β-catenin antibody and primers located in the coding sequences of *NURR1* and *NUR77*. (M and N) β-Catenin binding to *Nurr1* and *Nur77* regulatory regions is increased in adrenals from ΔCat mice. Adrenals from six wild-type and six ΔCat mice were fixed and the sheared chromatin was immunoprecipitated with control (Ig) or β-catenin (β) antibodies. PCRs were performed with primers flanking two conserved putative LEF/Tcf-binding sites in *Nurr1* regulatory regions (M) and four conserved AP1-binding sites in *Nur77* promoter (N). Boxed lanes represent control immunoprecipitation experiments performed with β-catenin antibody and primers located in the coding sequences of *Nurr1* and *Nur77*. Positions in the four cartoons are relative to the transcription start site. (O) *NURR1* and *NUR77* binding to *CYP11B2* regulatory regions is inhibited by



Sf-1 response element region in wild-type adrenals extracts (Fig. 5P, top panel). It also showed binding of Nur77 and to a lesser extent of Nurr1 to the distal sites (Fig. 5P, bottom panel). Binding of Nurr1 to the proximal Sf-1 response region was increased in  $\Delta$ Cat adrenals (Fig. 5P). There was also a mild increase in Nurr1 binding to the distal element, whereas Nur77 binding was not altered in  $\Delta$ Cat adrenals (Fig. 5P). Collectively, these data strongly suggested that  $\beta$ -catenin controlled *CYP11B2* expression indirectly, through stimulation of *NURR1* and *NUR77* transcription.

### Control of *CYP21* and *AT1R* expression involves direct and indirect mechanisms

We then addressed the mechanisms of *CYP21* regulation. As for *Cyp11b2*, induction by BIO in Y1 cells was abrogated by incubation with actinomycin D, suggesting that the effect of  $\beta$ -catenin on *Cyp21* expression was transcriptional (Fig. 6A). Computer-assisted promoter analysis identified one putative LEF/TCF-binding site (−82/−86) and two putative NUR response elements (−130/−135, −62/−67) upstream of the TSS in both human and mouse *CYP21* (Supplementary Material, Fig. S7). ChIP analysis in H295R cells showed binding of both  $\beta$ -catenin (Fig. 6B, top panel) and NURR1/NUR77 (Fig. 6B, bottom panel) to this promoter region. Binding of these three transcriptional activators was disrupted by PKF115-584 (Fig. 6B). This suggested that  $\beta$ -catenin could control expression of *CYP21* both directly (by interacting with LEF/TCF factors) and indirectly by stimulating NUR expression. Sequence analysis of mouse *Cyp21* regulatory regions identified four non-conserved distal (−629/−632, −623/−627, −608/−612, −370/−374) and three proximal putative Lef/Tcf-binding sites (−142/−146, −53/−57, −34/−30) as well as one putative Sf-1 (−280/−285) and four putative proximal Nur-binding sites (−189/−194, −122/−127, −49/−55, −4/−8) (Supplementary Material, Fig. S7). In wild-type mice,  $\beta$ -catenin binding was almost undetectable, whereas Nurr1 and Nur77 bound to the distal (Fig. 6C, top panel) and to a lesser extent to the proximal regions (Fig. 6C, bottom panel). Binding of  $\beta$ -catenin and *Nurr1* to the distal and proximal regions was markedly increased in  $\Delta$ Cat mice compared with wild-type mice (Fig. 6C). Altogether, these experiments suggested that *CYP21* was both a direct and indirect target of  $\beta$ -catenin in human adrenocortical cells and in mouse adrenals *in vivo*.

We finally addressed the regulation of *AT1R* expression by  $\beta$ -catenin. *In silico* analysis of *AT1R* regulatory regions showed

one putative LEF/TCF-binding site on human *AT1R* promoter. This site was conserved in mouse *At1a* regulatory regions (Supplementary Material, Fig. S8), but not in mouse *At1b* promoter, which harbored one putative Ap1-binding site (Supplementary Material, Fig. S9). ChIP analysis showed binding of  $\beta$ -catenin in a region surrounding the putative LEF-binding site (−502/−505) on human *AT1R* promoter in H295R cells. As expected, binding was markedly diminished by PKF115-584 treatment (Fig. 6D). In mouse adrenals, ChIP analysis showed binding of  $\beta$ -catenin to the regions surrounding the putative Lef- and Ap1-binding sites on *At1a* and *At1b* promoters, respectively (Fig. 6E). This was markedly increased in  $\Delta$ Cat, compared with wild-type adrenals (Fig. 6E). This strongly suggested that  $\beta$ -catenin could directly control expression of *AT1R* and *At1a/At1b* in human and mouse adrenocortical cells, respectively.

## DISCUSSION

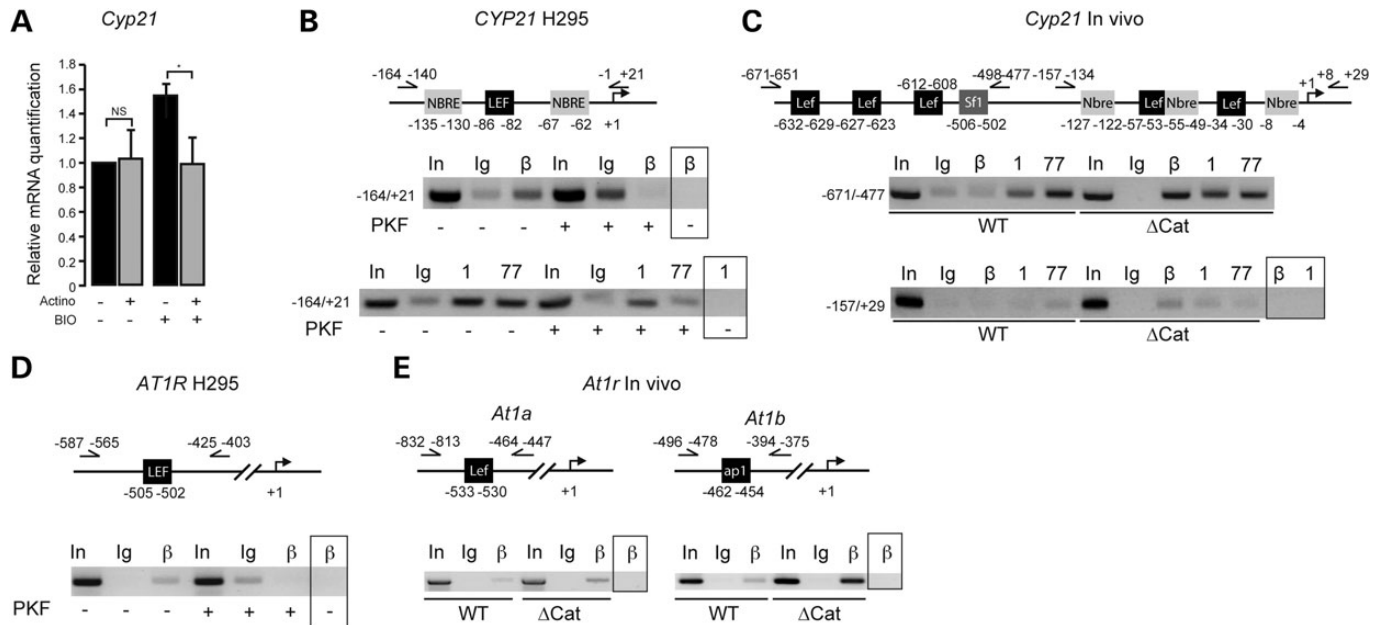
Our study provides strong immunohistochemical and molecular evidence that WNT/ $\beta$ -catenin signalling is aberrantly activated in 70% of APA in a series of 47 patients, which is the most frequent molecular alteration reported in APA, to our knowledge. The observation that mice with adrenal-specific constitutive activation of  $\beta$ -catenin displayed increased aldosterone production suggested that aberrant WNT signalling may be driving the development of APA (19). Here, using a combination of *in vitro* and *in vivo* experiments, we show that  $\beta$ -catenin is essential for both basal and Angiotensin II-induced aldosterone production. We further show that this function of  $\beta$ -catenin relies on its transcriptional activity, which stimulates expression of three major actors of aldosterone synthesis, i.e. *AT1R*, *CYP21* and *CYP11B2*, through direct and indirect mechanisms involving NURR1 and NUR77 (Fig. 7). Finally, we show that there is no obvious association between *KCNJ5* mutations and activation of WNT signalling, suggesting that the two pathways act independently in APA and may promote formation of different types of tumours. Altogether, these data strongly suggest that abnormal WNT pathway activation is closely associated with the development of PA in patients.

In the adrenal gland, constitutive WNT/ $\beta$ -catenin signalling has already been involved in the development of NAPA, micro- and macronodular hyperplasia and adrenocortical carcinomas (reviewed in 20). In most cases, increased activation, as assessed by immunohistochemistry or gene expression array analysis, was correlated with more aggressive disease (30–33). That WNT/ $\beta$ -catenin signalling plays a central role in the establishment of

PKF115-584. H295R cells were treated as described above and sheared chromatin was immunoprecipitated with 5  $\mu$ g of a control Ig, 5  $\mu$ g of an antibody to NURR1 (1) or 5  $\mu$ g of an antibody to NUR77 (77). PCRs were performed with one set of downstream primers flanking Ad1 and Ad5 sequences (top panel) and one set of upstream primers flanking the NBRE sequence (bottom panel). Boxed lane represents a control immunoprecipitation experiment performed with NURR1 antibody and primers located in the coding sequence of *CYP11B2*. (P) Nurr1 binding to mouse *Cyp11b2* regulatory regions is increased in adrenals from  $\Delta$ Cat mice. Adrenals from six wild-type and 6  $\Delta$ Cat mice were fixed and the sheared chromatin was immunoprecipitated with 5  $\mu$ g of a control immunoglobulin (Ig), 5  $\mu$ g of an antibody to Nurr1 (1) or 5  $\mu$ g of an antibody to Nur77 (77). PCRs were performed with one set of downstream primers flanking a putative Sf-1-binding site (top panel) and one set of upstream primers flanking putative Sf-1 and nuclear receptors binding sites (NRBS, bottom panel). Boxed lane represents a control immunoprecipitation experiment performed with NURR1 antibody and primers located in the coding sequence of *Cyp11b2*. Positions in the two cartoons are relative to the transcription start site. All ChIP experiments were repeated at least three times. 'In' refers to 10% of the amount of chromatin that was loaded in each immunoprecipitation and serves as a reference (10% input). Bars in (A)–(D) and (I) and (J) represent the mean relative quantification of at least four individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. Bars in (E) and (F) represent the mean relative quantification ( $n = 6$ )  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses in (A)–(D) and (I) and (J) were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Statistical analyses in (E) and (F) were conducted by Student's *t*-test. Statistical analyses in (G) and (H) were conducted by Welch's *t*-test to account for different variances. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.0005$ ; NS, not significant.







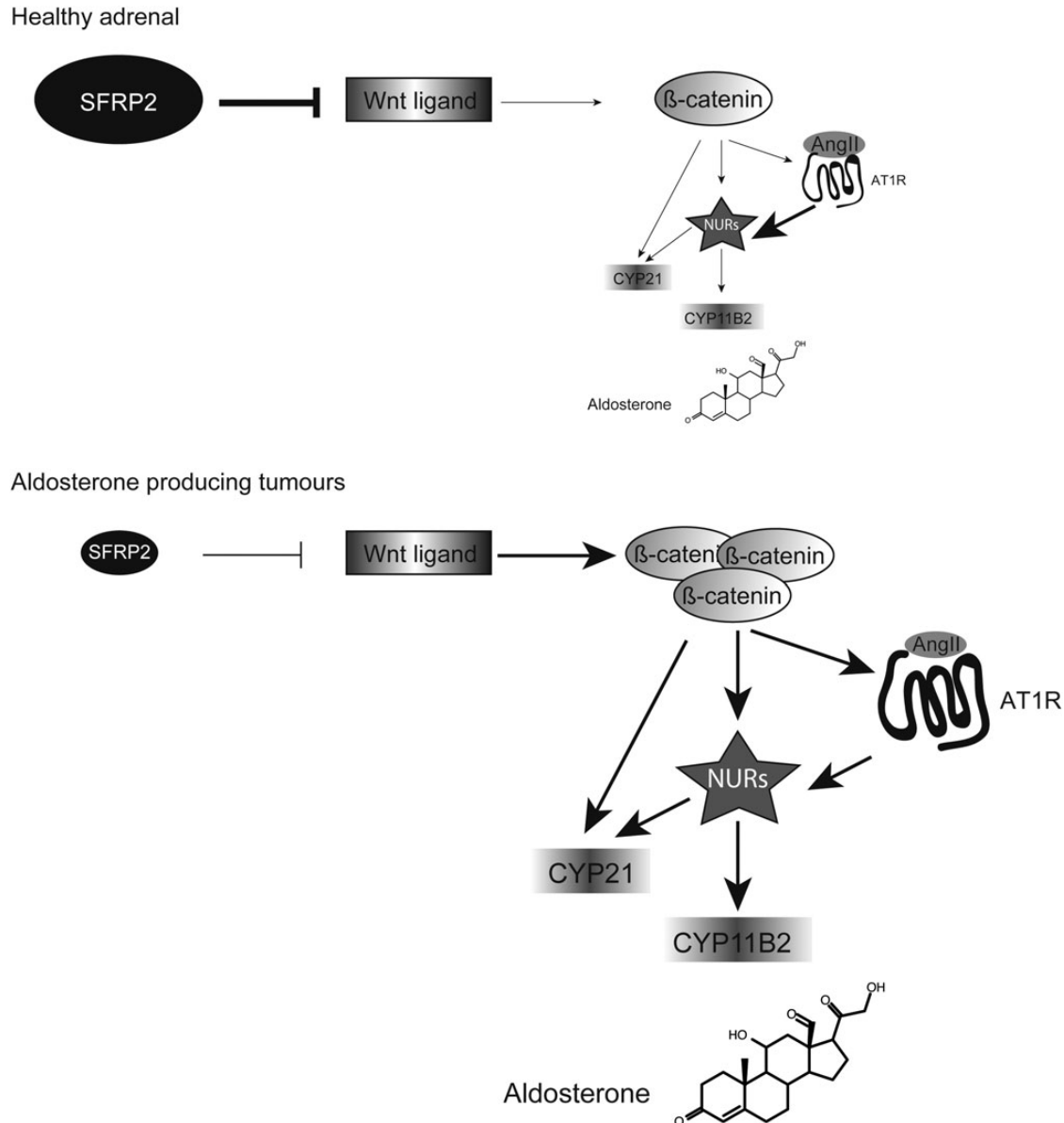
**Figure 6.**  $\beta$ -Catenin stimulates *CYP21* and *AT1R* expression. (A)  $\beta$ -Catenin induces transcription of *Cyp21*. *Cyp21* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from Y1 cells stimulated by DMSO (control group) or 500 nM BIO alone or in combination with 100 nM actinomycin D for 6 h. Bars represent the mean relative quantification of at least four individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. (B)  $\beta$ -Catenin and NURs binding to *CYP21* promoter is inhibited by PKF115-584. H295R cells were treated as described in Figure 5 and sheared chromatin was immunoprecipitated with 5  $\mu$ g of a control immunoglobulin (Ig), 5  $\mu$ g of an antibody to  $\beta$ -catenin ( $\beta$ , top panel), 5  $\mu$ g of an antibody to NURR1 (1, bottom panel) or 5  $\mu$ g of an antibody to NUR77 (77, bottom panel). PCRs were performed with primers flanking one putative LEF/TCF-binding site and one NBRE. Boxed lanes represent control immunoprecipitation experiments performed with  $\beta$ -catenin and NURR1 antibodies and primers located in the coding sequence of *CYP21*. (C)  $\beta$ -Catenin and Nurr1 binding to mouse *Cyp21* promoter is increased in  $\Delta$ Cat adrenals. Adrenals from six wild-type and six  $\Delta$ Cat mice were fixed and the sheared chromatin was immunoprecipitated with 5  $\mu$ g of a control immunoglobulin (Ig), 5  $\mu$ g of an antibody to  $\beta$ -catenin ( $\beta$ ), 5  $\mu$ g of an antibody to Nurr1 (1) or 5  $\mu$ g of an antibody to Nur77 (77). PCRs were performed with one set of upstream primers flanking a combination of putative Lef/Tcf, Nbre and Sf-1-binding sites (top panel) and one set of downstream primers flanking putative Lef/Tcf and Nbre-binding sites (bottom panel). Boxed lanes represent control immunoprecipitation experiments performed with  $\beta$ -catenin and NURR1 antibodies and primers located in the coding sequence of *Cyp21*. (D)  $\beta$ -Catenin binding to *AT1R* promoter is inhibited by PKF115-584. H295R cells were treated as described above and sheared chromatin was immunoprecipitated with 5  $\mu$ g of a control immunoglobulin (Ig) or 5  $\mu$ g of an antibody to  $\beta$ -catenin ( $\beta$ ). PCRs were performed with primers flanking one putative LEF/TCF-binding site. Boxed lane represents a control immunoprecipitation experiment performed with  $\beta$ -catenin antibody and primers located in the coding sequence of *AT1R*. (E)  $\beta$ -Catenin binding to *At1a* and *At1b* promoters is increased in  $\Delta$ Cat adrenals. Adrenals from six wild-type and six  $\Delta$ Cat mice were fixed and the sheared chromatin was immunoprecipitated with 5  $\mu$ g of a control immunoglobulin (Ig), or 5  $\mu$ g of an antibody to  $\beta$ -catenin. PCRs were performed with one set of primers flanking a putative Lef1-binding site in *At1a* promoter (left panel) and one set of primers flanking one putative Ap1 site in *At1b* promoter (right panel). Positions in the three cartoons are relative to the transcription start site. Boxed lanes represent control immunoprecipitation experiments performed with  $\beta$ -catenin antibodies and primers located in the coding sequences of *At1a* and *At1b*. All ChIP experiments were repeated at least three times. 'In' refers to 10% of the amount of chromatin that was loaded in each immunoprecipitation and serves as a reference (10% input). Statistical analysis in (A) was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. \* $P < 0.05$ ; NS, not significant.

APA, in essence a benign adrenal tumour thus seems puzzling. However, one essential aspect of WNT signalling is its high sensitivity to dosage, which is essential for A–P axis and organ patterning. This is also reflected in different dosage requirements for tumorigenesis in transgenic mouse models (34–38). In our previously published mouse model of constitutive  $\beta$ -catenin activation (19), although a good number of cells with accumulation of  $\beta$ -catenin displayed *Cyp11b2* expression, cells with highest levels of accumulation were rather undifferentiated Fig. 5 in reference 19. Furthermore, the most aggressive tumours in  $\Delta$ Cat mice did not overproduce aldosterone (19) (Supplementary Material, Fig. S4 in reference 19). This suggests that levels of WNT dosage may also play a central role in the development of specific types of tumours within the adrenal cortex.

The mechanisms involved in WNT pathway activation in non-aldosterone secreting adrenal tumours are not completely understood. However, 36% of adrenocortical adenomas (usually the largest ones) and 16% of carcinomas (usually the most aggressive ones) display activating mutations of the *CTNNB1* gene (30,31,32). In contrast, our analysis of

*CTNNB1* gene sequence failed to identify any activating mutations in APA, which was in line with previously published data (21). It is therefore possible that the levels of WNT pathway activation achieved in APA differ quite significantly from the levels found in other adrenal tumours. Here, using transcriptome and RTqPCR analyses, we show down-regulation of the secreted WNT inhibitor *SFRP2* (39), which is significantly inversely correlated with *AXIN2* and *CYP11B2* expression. We also demonstrate for the first time that *Sfrp2* knockout mice have significantly increased plasma aldosterone levels that are significantly correlated with increased *Axin2* expression, abnormal  $\beta$ -catenin accumulation and marked adrenal dysplasia. Although it is quite likely that other factors play a role in WNT pathway activation in APA, our data strongly suggest that decreased *SFRP2* expression contributes to the establishment of a particular dosage of WNT signalling, which is associated with the development of APA. In light of these observations, it will be interesting to evaluate expression of WNT pathway regulators in other types of adrenal tumours, in correlation with WNT signalling activity.





**Figure 7.** Synthetic representation of the main findings of this study. In a healthy adrenal (top panel), WNT signalling is maintained at a basal level by the action of SFRP2 (and presumably other actors of WNT signalling). Aldosterone secretion is stimulated by Angiotensin II through a cascade involving binding of Angiotensin II to its receptor AT1R, which stimulates NURR1 and NUR77 (NURs) expression. These in turn control the expression of CYP21 and CYP11B2, two enzymes essential for aldosterone production. Whether  $\beta$ -catenin plays a role in the control of aldosterone production in a healthy adrenal is unknown. In aldosterone-producing tumours (bottom panel), down-regulation of SFRP2 (or other regulators) results in deregulated WNT/ $\beta$ -catenin activation (70% of APA).  $\beta$ -Catenin is constitutively bound to the promoters of *AT1R*, *NURR1* and *NUR77*. This results in increased expression of these genes, which in turn stimulates expression of *CYP21* and *CYP11B2*, leading to increased production of aldosterone.

*SFRP2* expression is decreased in a number of tumour types where it correlates with increased WNT signalling. In most tumours, down-regulation of *SFRP2* expression is the result of increased promoter DNA methylation (23,40,41). Although we cannot rule out increased methylation in a subset of cells within APA tissues, our global methylation analyses using pyrosequencing do not show an overall increase in the methylation status of *SFRP2* regulatory regions (Supplementary Material, Fig. S10). This suggests involvement of some other molecular mechanisms. Interestingly, micro-RNAs miR-218 (42), miR-29 (43), miR-410, miR-433 (44) and miR-224 (45) have

been proposed as regulators of *SFRP2* expression and WNT signalling. It is therefore tempting to speculate that overexpression of some of these micro-RNAs could account for decreased *SFRP2* expression in APA.

Our observations raise the question of the role of WNT signalling in zona-glomerulosa physiology. Active  $\beta$ -catenin, identified by nucleo-cytoplasmic staining in immunohistochemistry is found mostly restricted to the adrenal zona glomerulosa in wild-type mice (19,46) and in healthy subjects (21), which suggests that WNT pathway is normally activated in this specific zone. Unfortunately, mice with Sf-1:Cre-mediated ablation of



$\beta$ -catenin exhibit adrenal aplasia in late development, which precludes analysis of postnatal adrenal function (46). Interestingly, however, *Wnt4* knockout mice have impaired zona-glomerulosa differentiation and lower plasma aldosterone concentration at birth. This effect is zone specific as *Cyp21a1* expression and corticosterone levels are not altered (47). Conversely, overexpression of WNT4 in human adrenocortical cell lines increases *CYP11B2* expression and aldosterone production (48). This strongly suggests that WNT4 may be essential to establish a normal pattern of  $\beta$ -catenin activation in adrenal zona glomerulosa. On the basis of our data, we can speculate that this pattern of activation could be involved in the establishment of zona-glomerulosa identity through stimulation of *AT1R* and *CYP11B2* expression. Interestingly, our experiments show that  $\beta$ -catenin knockdown not only decreases aldosterone production but also robustly stimulates CYP17 expression (Supplementary Material, Fig. S11A) and DHEA (Supplementary Material, Fig. S11B) production at the expense of cortisol (Supplementary Material, Fig. S11C) in H295R cells. Although cell culture experiments are to be considered with caution, this suggests that alterations in WNT signalling pathway activity and  $\beta$ -catenin dosage can result in a switch from one hormonal production phenotype to another. It is therefore tempting to speculate that localized WNT signalling pathway activation plays an essential role in the establishment of functional adrenal zonation through both promotion of zona glomerulosa and inhibition of zona fasciculata/reticularis differentiation. Future experiments aiming at inactivating *Ctnnb1* specifically in zona-glomerulosa or fasciculata cells should clarify these hypotheses.

$\beta$ -Catenin is involved in the control of steroidogenesis in the ovary, where its activity relies on physical and functional interactions with the nuclear receptor SF-1 on *Star* and *CYP19A1* promoter (49–53). In contrast, we have shown that  $\beta$ -catenin controls adrenal expression of *CYP21* and *CYP11B2* through a novel molecular mechanism involving stimulation of the transcription of the NGFIB family nuclear receptors, NURR1 and NUR77. NUR77 was previously identified as a target gene of  $\beta$ -catenin in colon cancer lines (29). Here, we extend these findings to the adrenal cortex *in vitro* and *in vivo*. We also show that NURR1, another member of the NGFIB family of nuclear receptors, is a transcriptional target for  $\beta$ -catenin. Interestingly, both NUR77 and NURR1 have been shown to inhibit the activity of  $\beta$ -catenin either by inducing its degradation (54) or by decreasing its activity as a transcriptional coactivator (55). These observations are suggestive of a regulation loop in which  $\beta$ -catenin induces NGFIB family members expression which in turn negatively feedback on the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin. Our mechanistic findings are thus likely to extend to a number of tissues such as the pancreas, lung or cervix in which both  $\beta$ -catenin and NGFIB nuclear receptors have been involved in tumorigenesis (56–58).

Treatment of a majority of PA cases relies on mineralocorticoid-receptor antagonists. However, most of the time, these inhibitors do not achieve normalization of blood pressure and are associated with endocrine side effects, which decrease patients' compliance with treatment (4–6). We have conducted a pilot study in which  $\Delta$ Cat mice were fed a control or 0.2% quercetin-enriched diet (Supplementary Material, Fig. S12). After 90 days on the specific diets, mice receiving quercetin showed a significant and specific decrease in aldosterone

production (Supplementary Material, Fig. S12A and B), which was correlated with decreased Wnt pathway activity (Supplementary Material, Fig. S12C). Quercetin is the most abundant dietary flavonoid endowed with the capacity to inhibit multiple intracellular signalling pathways, amongst which  $\beta$ -catenin interaction with LEF/TCF (59,60). Interestingly, increased quercetin consumption is associated with a decrease in blood pressure in animal models (61) and in hypertensive patients (62). Although multiple molecular mechanisms have been proposed to account for these activities (62), on the basis of our data, we propose that some of the hypotensive effects of quercetin may be mediated by inhibition of WNT signalling and aldosterone secretion in the adrenal cortex. The broad spectrum of quercetin activities is probably incompatible with clinical use as an inhibitor of WNT signalling. However, small molecule drugs targeting  $\beta$ -catenin are emerging in Phase I and II clinical trials (63). Their therapeutic potential for the treatment of PA remains to be evaluated.

In conclusion, our data provide novel molecular insights that account for a large number of APA in patients. They show that aberrant WNT pathway activation plays a central role in the aetiology of this disease and suggest that it may be a relevant pharmacological target to allow normalization of aldosterone production in patients with APA.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics statement

Studies on patients' samples were conducted in agreement with the principles of the declaration of Helsinki and were approved by CPP (Comité de Protection des Personnes) Ile de France II. All participants gave informed consent for the study. All animal studies were approved by Auvergne Ethics committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare (protocols CE 76-12 and CE 77-12).

### Patients

We obtained formalin-fixed and paraffin-embedded adrenals through the COrtico- et MEDullo-surrénale Tumeurs Endocrines (COMETE) network from 31 patients and 17 patients who had undergone surgery for APA at Hôpital Européen Georges Pompidou and Cochin Hospital, respectively (Plan Hospitalier de Recherche Clinique Grant AOM06179 to the COMETE-INCa network). The clinical and biological characteristics of the patients are summarized in Supplementary Material, Table S1A. Methods for screening and criteria for diagnosing PA and APA were in accordance with institutional guidelines. For controls, we selected 17 secreting NAPA, which were diagnosed in the Endocrinology Department of Cochin Hospital. These did not have nucleocytoplasmic accumulation of  $\beta$ -catenin, which was considered as the criteria for absence of constitutive Wnt pathway activation. Our retrospective transcriptome analyses were performed with the datasets from six APA and four control adrenals of the Cochin/COMETE series that were previously analysed on cDNA microarrays (22). These analyses were carried out using 'R' (<http://www.r-project.org/>). The LIMMA test was used for group comparisons (LIMMA R package) and *P* values were adjusted using the



Benjamini–Hochberg correction method. All data are available on ArrayExpress web site (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>, experiment E-TABM-311, samples CIT-HS-ACT-EC-ACA17, CIT-HS-ACT-EC-ACA19, CIT-HS-ACT-EC-ACA29, CIT-HS-ACT-EC-ACA39, CIT-HS-ACT-EC-ACA40, CIT-HS-ACT-EC-ACA42, CIT-HS-ACT-EC-NA1, CIT-HS-ACT-EC-NA2, CIT-HS-ACT-EC-NA3, CIT-HS-ACT-EC-NA4). RTqPCR analyses were performed on the same 6 APA and 11 NAPA as well as on 29 additional APA from the HEGP/COMETE series and 6 NAPA from the Cochlin/COMETE series (see Supplementary Material, Table S1B). Seven NA were obtained from radical nephrectomies (Cochlin/COMETE and Rouen/COMETE). All patients gave written informed consent to participate to the study.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry for  $\beta$ -catenin, Dab2 and Cyp11b2 was performed on tissues embedded in paraffin as previously described (19,26,64). For patients' samples, the entirety of  $\beta$ -catenin-stained sections was examined. Immunohistochemical labelling was evaluated by a trained pathologist for the presence of membrane, cytoplasmic and nuclear staining by a qualitative assessment. The intensity of staining was not scored. Images were acquired with a Zeiss Axioplan 2 microscope and Axiocam HR camera. They were minimally processed for global levels and white balance using Adobe Photoshop®.

### In situ hybridization

*In situ* hybridization analyses for human *CYP11B2* detection were conducted as previously described (21).

### Patients' DNA sequencing

For identification of *KCNJ5* mutations, the DNA coding for amino acids 122–199 was sequenced as described in (17). Mutations in the third and fifth exons of *CTNNB1* gene were analysed as described in (21).

### Genomic DNA methylation analysis

Methylation analyses were conducted on genomic DNA from 4 NA, 15 NAPA devoid of  $\beta$ -catenin activation and 11 APA (see Supplementary Material, Table S1B). Genomic DNA was extracted from tumour samples using standard procedures and 500 ng of sample DNA were bisulfite treated by EpigenDx (Hopkinton, MA, USA) using a proprietary bisulphite salt solution. Briefly, DNA was diluted to 45 and 5  $\mu$ l of 3 N NaOH were added, followed by a 30-min incubation at 42°C to denature the DNA. One hundred microliters of bisulfite salt solution were added to the DNA and incubated for 14 h at 50°C. Bisulfite-treated DNA was purified using Zymogen DNA columns and was eluted 20  $\mu$ l of TE, pH 8.0. One microliter of the converted DNA was used for each PCR reaction. The PCR was performed with 0.2  $\mu$ M of each primer. One of the PCR primers was biotinylated to purify the final PCR product using Sepharose beads. The PCR product was bound to Streptavidin Sepharose HP (GE Healthcare), and the Sepharose beads containing the immobilized PCR product were purified, washed and denatured using

a 0.2-M NaOH solution. They were washed using the Pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Pyrosequencing, Qiagen) as recommended by the manufacturer. Then 0.2  $\mu$ M pyrosequencing primer was annealed to the purified single-stranded PCR product. Ten microliters of the PCR products were sequenced by Pyrosequencing PSQ96 HS System (Biotage AB) following the manufacturer's instructions (Pyrosequencing, Qiagen). The methylation status of each locus was analysed individually as a T/C SNP using QCpG software (Pyrosequencing, Qiagen). The percentage of methylation at each CpG site was compared between normal adrenal, NAPA and APA using Anova followed by Tukey's *post hoc* test.

### Mice

All animal studies were approved by Auvergne Ethics committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare (protocols CE 76-12 and CE 77-12). *Sfrp2* mice (on a Sv129EV/C57Bl6 mixed background) were kindly provided by Dr Brendan Lee and were previously described (24).  $\Delta$ Cat mice (on a pure C57Bl6 background) were generated in our lab and were previously characterized (19). Female *Sfrp2* knockout mice were fed a standard diet (SAFE, U8958v106). Blood was collected by retro-orbital puncture in 2  $\mu$ l EDTA at different time points and used for plasma aldosterone concentration measurement. Individual increases in plasma aldosterone were found as early as 7 months but were only significant in the knockout group at 13 months. After the experiment, mice were euthanized by decapitation and blood was collected on vacuum blood collection tubes (VF-053STK, Terumo). Adrenals were either frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% PFA. Ten-month-old female  $\Delta$ Cat mice were fed with either a standard control diet (Safe, A03) or a 0.2% quercetin-enriched diet (based on Safe A03) for 3 months. Blood and tissues were collected and processed as described above. Littermate control animals were used in all experiments.

### Cell culture

Human adrenocortical cancer H295R cell line was grown as previously described with DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (S1800-500, Biowest), 2 mM L-glutamine (25030, Gibco), 50 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and  $1 \times$  insulin-transferrin-selenium (41400-045, Gibco). Mouse adrenocortical tumour Y1 cell line was grown with DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (S1800-500, Biowest), 2 mM L-glutamine (25030, Gibco), 50 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin.

### Statistical analyses

Statistical analysis of RTqPCR, western-blot and transfection data was performed with GraphPad Prism5 software. When *t*-test was applied, variance was always evaluated. In case of unequal variances, Welch's *t*-test was performed. In all boxplot and scatter plot representations whiskers show the minimum and maximum values for each population. For methylation analyses, outliers are represented as dots detached from the boxplots.





## Plasmids

TOP- and FOP-FLASH vectors were a kind gift of Dr Perret (Institut Cochin). Reporter plasmids hCYP11B2 (pB2-1521) WT and NBRE/Ad5/Ad1M were kindly provided by William E. Rainey (Department of Physiology, Medical college of Georgia, Augusta, GA, USA) (28). For the LEF/TCF mutant construct, the two LEF/TCF sequences 5'-CTTTGCTG-3' (−1266/−1273) and 5'-CTTTGAAAAGG-3' (−768/−774) were changed to 5'-agggtcgG-3' and 5'-agggtccAAGG-3', respectively, using the QuickChange II kit (Stratagene). All bases were numbered relative to hCYP11B2 transcriptional start site.

## Cell transfections and treatment

H295R cells were seeded at a density of  $8 \times 10^5$  cells per well in 6-well plate. The day after seeding, 1  $\mu$ g of reporter plasmid DNA was transiently transfected using Transfast reagent (Promega) according to manufacturer's instructions. Following transfection, cells were incubated with 2 ml minimum medium for 16 h (DMEM/F12 medium containing L-glutamine and antibiotic). Where indicated, cells were pre-treated for 24-h with 1.0  $\mu$ M PKF115-584 (WNT/ $\beta$ -catenin inhibitor, EI-198-0100, Enzo Life Sciences), followed by 10 nM of Angiotensin II (A9525, Sigma-Aldrich) alone or in combination with PKF115-584 for 6 h. Control cells were treated with DMSO, which was used as the vehicle for PKF115-584. Cells were then lysed in reporter lysis buffer (E3971, Promega) and assayed for luciferase activity with the GenofaxA luciferase assay system (Yelen). All experiments were performed in triplicate and repeated at least thrice.

To evaluate the effect of Wnt pathway inhibition, H295R cells were seeded in 6-well plate at a density of  $8 \times 10^5$  cells per well plate and cultured in minimum medium overnight before pre-treatment for 24-h with 0.5 or 1.0  $\mu$ M PKF115-584 or DMSO (control group). After this, the cells were treated with 10 nM of Angiotensin II alone or in combination with PKF115-584 for 6 h.

For knockdown experiments, siRNA sequences targeting  $\beta$ -catenin 5'-AGCUGAUUAUGAUGGACAG-3' and GFP 5'-ACUACCAGCAGAACACCCCUU-3' were used. H295R cells were seeded in 6-well plate at a density of  $4 \times 10^5$  and siRNAs were transfected twice at 24 h intervals, using Effectene reagent (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Five days after the first transfection, cells were deprived of serum overnight and were induced for 6 h with 10 nM Angiotensin II.

For induction of Wnt pathway activity, Y1 cells were seeded in 6-well plate at a density of  $3 \times 10^5$  cells per well and cultured in minimum medium overnight, before treatment with 500 nM BIO (B1686, Sigma) or DMSO (control group) in the presence or absence of 100 nM actinomycin D for the indicated amount of time. For TOP/FOP-FLASH assays,  $3 \times 10^5$  Y1 cells were transfected with 1  $\mu$ g of each plasmid using Metafectene (Biontex) in complete medium for 6–7 h. They were then cultured in minimum medium overnight and treated with DMSO or BIO as described above, for 6 h.

## Reverse-transcription quantitative PCR

Cells were harvested in lysis buffer and total mRNAs were extracted using RNeasy nucleotide extraction kit (Macherey

Nagel) according to manufacturer's instructions. One microgram of mRNA was reverse transcribed for 1 h at 42°C with 5 pmol of random hexamers primers, 200 units reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 units RNasin (N2615, Promega). One microliter of a one-tenth dilution of cDNA was used in each quantitative PCR. This was conducted with Taqman<sup>®</sup> probes of the Gene Expression Assay pool (Applied Biosystems, see below) or MESA GREEN Mastermix Plus (RT-SY2X-06+WOUFL, Eurogentec). Primers and probes are listed in Supplementary Material, Tables S2 and S3.

## Western blot

Thirty micrograms of total proteins were loaded on a 10% SDS–PAGE gel, transferred onto nitrocellulose and detected with an antibody to  $\beta$ -catenin 1/1000 (610153, BD Biosciences Pharmingen), NURR1 1/500 (sc-991, Santa Cruz) and NUR77 1/1000 (sc-990, Santa Cruz). Expression of these proteins was normalized to expression of  $\beta$ -actin (A2066, Sigma) and signals were quantified with a DNR MF ChemiBis 3.2 camera and Multi Gauge software suite (Fujifilm).

## Chromatin immunoprecipitation

H295R cells were seeded at a density of  $5 \times 10^6$  per 10 cm dish and treated with 1.0  $\mu$ M PKF115-584 for 30 h. Following treatment, they were fixed by addition of 1% formaldehyde to the culture medium for 10 min. Fixation was stopped by addition of 125  $\mu$ M glycine. Cells were rinsed three times with PBS and scraped in CLB buffer (5 mM PIPES, 85 mM KCl, 0.5% NP40). After centrifugation, nuclei pellet was resuspended in NLB buffer (50 mM Tris–HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) and incubated on ice for 45 min. Chromatin was then sheared to an average length of 500 pb and submitted to immunoprecipitation with 5  $\mu$ g of antibodies directed against  $\beta$ -catenin (610153, BD Biosciences Pharmingen), NURR1 (sc-991, Santa Cruz), NUR77 (sc-990, Santa Cruz) or non-immune IgG controls (Millipore). Chromatin-antibodies complexes were collected with protein A or G magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen). After seven washes in IP buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris–HCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 1% Triton X-100), beads were resuspended in 100  $\mu$ l of 10% Chelex slurry and DNA was recovered as previously described (65).

For *in vivo* ChIP, six WT or  $\Delta$ Cat adrenals gland were cross-linked in PBS with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Fixation was stopped with 125  $\mu$ M glycine and adrenals were rinsed three times with PBS. Tissues were then disrupted in CLB with a glass tissue grinder. The next steps of the protocol were as described above for H295R cells. Primer pairs used for ChIP are listed in Supplementary Material, Table S4. For all ChIP experiments, specificity controls were performed with primers hybridizing within the coding sequence of each candidate gene (Supplementary Material, Table S4).

## Hormone measurement

Aldosterone, DHEA, cortisol and corticosterone were quantified in plasma and cell medium using an aldosterone ELISA kit (CAN-ALD-450, Diagnostic Biochem Canada), a DHEA



ELISA kit (CAN-DH-490, Diagnostic Biochem Canada), a Cortisol ELISA kit (CAN-C-270, Diagnostic Biochem Canada) and a corticosterone 3H kit (MP Biomedicals) according to manufacturers' instructions. For cell medium quantifications, hormone concentrations were normalized to total cellular proteins measured by Bradford assays (Bio-Rad). Renin was measured by direct chemiluminescence with the Liaison Direct Renin kit (Diasorin), according to manufacturer's instructions.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank B. Terris at Cochin Tumour Bank and the COMETE (CORTico MEDullo Tumeurs Endocrines) network for the provision of APA tissue samples, Dr Brendan Lee (Baylor College of Medicine, Houston, USA) for kindly allowing us to use *Sfrp2* knockout mice, Dr William E Rainey (Medical college of Georgia, USA) for providing *CYP11B2* reporter constructs and Dr Ed Laufer (Columbia University, New York) for provision of antibodies. We also thank Khirredine Ouchen, Sandrine Plantade and Philippe Mazuel for animal care.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## FUNDING

This work was supported through institutional support from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Université Blaise Pascal; Université d'Auvergne; Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur and grants from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (SFI 20101201397; young researcher grant to A.B.); La Ligue Contre le Cancer, Allier committee; Agence Nationale pour la Recherche [013-01 and 08-GENO-021]; Fondation pour la Recherche sur l'Hypertension Artérielle; Fondation pour la recherche médicale [ING20101221177] and Programme Hospitalier de Recherche Clinique [AOM 06179].

## REFERENCES

- Plouin, P.-F., Amar, L. and Chatellier, G. (2004) Trends in the prevalence of primary aldosteronism, aldosterone-producing adenomas, and surgically correctable aldosterone-dependent hypertension. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **19**, 774–777.
- Amar, L., Plouin, P.-F. and Steichen, O. (2010) Aldosterone-producing adenoma and other surgically correctable forms of primary aldosteronism. *Orphanet J. Rare Dis.*, **5**, 9.
- Fagugli, R.M. and Taglioni, C. (2011) Changes in the perceived epidemiology of primary hyperaldosteronism. *Int. J. Hypertens.*, **2011**, 162804.
- Steichen, O., Zinzindohoué, F., Plouin, P.-F. and Amar, L. (2012) Outcomes of adrenalectomy in patients with unilateral primary aldosteronism: a review. *Horm. Metab. Res.*, **44**, 221–227.
- Rossi, G.P.D. (2011) Diagnosis and treatment of primary aldosteronism. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **12**, 27–36.
- Jeunemaitre, X., Chatellier, G., Kreft-Jais, C., Charru, A., DeVries, C., Plouin, P.-F., Corvol, P. and Menard, J. (1987) Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. *Am. J. Cardiol.*, **60**, 820–825.
- Amar, L., Azizi, M., Menard, J., Peyrard, S., Watson, C. and Plouin, P.-F. (2010) Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*, **56**, 831–838.
- Calhoun, D.A., White, W.B., Krum, H., Guo, W., Bermann, G., Trapani, A., Lefkowitz, M.P. and Ménard, J. (2011) Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial. *Circulation*, **124**, 1945–1955.
- Heitzmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., El Wakil, A., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R. *et al.* (2008) Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J.*, **27**, 179–187.
- Davies, L.A., Hu, C., Guagliardo, N.A., Sen, N., Chen, X., Talley, E.M., Carey, R.M., Bayliss, D.A. and Barrett, P.Q. (2008) TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2203–2208.
- Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A. *et al.* (2010) Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat. Med.*, **16**, 67–74.
- Oki, K., Plonczynski, M.W., Lam, M.L., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2012) The potassium channel, Kir3.4 participates in Angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. *Endocrinology*, **153**, 4328–4335.
- Monticone, S., Hattangady, N.G., Nishimoto, K., Mantero, F., Rubin, B., Cicala, M.V., Pezzani, R., Auchus, R.J., Ghayee, H.K., Shibata, H. *et al.* (2012) Effect of KCNJ5 mutations on gene expression in aldosterone-producing adenomas and adrenocortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **97**, E1567–E1572.
- Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., Björklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C.J. *et al.* (2011) K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*, **331**, 768–772.
- Azizan, E.A.B., Lam, B.Y.H., Newhouse, S.J., Zhou, J., Kuc, R.E., Clarke, J., Happerfield, L., Marker, A., Hoffman, G.J. and Brown, M.J. (2012) Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **97**, E819–E829.
- Beuschlein, F., Boulkroun, S., Osswald, A., Wieland, T., Nielsen, H.N., Lichtenauer, U.D., Penton, D., Schack, V.R., Amar, L., Fischer, E. *et al.* (2013) Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat. Genet.*, **45**, 1038–1042.
- Boulkroun, S., Beuschlein, F., Rossi, G.-P., Golib-Dzib, J.-F., Fischer, E., Amar, L., Mulatero, P., Samson-Couterie, B., Hahner, S., Quinkler, M. *et al.* (2012) Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension*, **59**, 592–598.
- Åkerström, T., Crona, J., Delgado Verdugo, A., Starker, L.F., Cupisti, K., Willenberg, H.S., Knoefel, W.T., Saeger, W., Feller, A., Ip, J. *et al.* (2012) Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS ONE*, **7**, e41926.
- Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefrançois-Martinez, A.M. *et al.* (2010) Constitutive [beta]-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1561–1576.
- Berthon, A., Martinez, A., Bertherat, J. and Val, P. (2011) Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **351**, 87–95.
- Boulkroun, S., Samson-Couterie, B., Golib-Dzib, J.-F., Amar, L., Plouin, P.-F., Sibony, M., Lefebvre, H., Louiset, E., Jeunemaitre, X., Meatchi, T. *et al.* (2011) Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology*, **152**, 4753–4763.
- De Reynies, A., Assie, G., Rickman, D.S., Tissier, F., Groussin, L., Rene-Corail, F., Dousset, B., Bertagna, X., Clauser, E. and Bertherat, J. (2009) Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J. Clin. Oncol.*, **27**, 1108–1115.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M. *et al.*



- (2004) Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.*, **36**, 417–422.
24. Morello, R., Bertin, T.K., Schlaubitz, S., Shaw, C.A., Kakuru, S., Munivez, E., Hermanns, P., Chen, Y., Zabel, B. and Lee, B. (2008) Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. *J. Cell. Physiol.*, **217**, 127–137.
  25. Romero, D.G., Yanes, L.L., de Rodriguez, A.F., Plonczynski, M.W., Welsh, B.L., Reckelhoff, J.F., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (2007) Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology*, **148**, 2644–2652.
  26. Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemonne, K., Fumey, G., Hagnere, A.M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X. *et al.* (2005) Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.*, **65**, 7622–7627.
  27. Lepourcelet, M., Chen, Y.N., France, D.S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A.W. and Shivdasani, R.A. (2004) Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell*, **5**, 91–102.
  28. Bassett, M.H., Suzuki, T., Sasano, H., White, P.C. and Rainey, W.E. (2004) The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 279–290.
  29. Wu, H., Lin, Y., Li, W., Sun, Z., Gao, W., Zhang, H., Xie, L., Jiang, F., Qin, B., Yan, T. *et al.* (2011) Regulation of Nur77 expression by beta-catenin and its mitogenic effect in colon cancer cells. *FASEB J.*, **25**, 192–205.
  30. Ragazzon, B., Libe, R., Gaujoux, S., Assie, G., Fratticci, A., Launay, P., Clauser, E., Bertagna, X., Tissier, F., de Reynies, A. *et al.* (2010) Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res.*, **70**, 8276–8281.
  31. Gaujoux, S., Grabar, S., Fassnacht, M., Ragazzon, B., Launay, P., Libe, R., Chokri, I., Audebourg, A., Royer, B., Sbiara, S. *et al.* (2011) beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **17**, 328–336.
  32. Bonnet, S., Gaujoux, S., Launay, P., Baudry, C., Chokri, I., Ragazzon, B., Libe, R., Rene-Corail, F., Audebourg, A., Vacher-Lavenu, M.C. *et al.* (2011) Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, E419–E426.
  33. Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., Horvath, A., Stratakis, C.A. and Bourdeau, I. (2008) Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **69**, 367–373.
  34. Li, Q., Ishikawa, T.-O., Oshima, M. and Taketo, M.M. (2005) The threshold level of adenomatous polyposis coli protein for mouse intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.*, **65**, 8622–8627.
  35. Kielman, M.F., Rindapää, M., Gaspar, C., van Poppel, N., Breukel, C., van Leeuwen, S., Taketo, M.M., Roberts, S., Smits, R. and Fodde, R. (2002) Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat. Genet.*, **32**, 594–605.
  36. Albuquerque, C., Breukel, C., van der Luijt, R., Fidalgo, P., Lage, P., Slors, F.J.M., Leitão, C.N., Fodde, R. and Smits, R. (2002) The 'just-right' signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1549–1560.
  37. Buchert, M., Athineos, D., Abud, H.E., Burke, Z.D., Faux, M.C., Samuel, M.S., Jamicki, A.G., Winbanks, C.E., Newton, I.P., Meniel, V.S. *et al.* (2010) Genetic dissection of differential signaling threshold requirements for the Wnt/beta-catenin pathway in vivo. *PLoS Genet.*, **6**, e1000816.
  38. Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C. *et al.* (2006) Apc tumor suppressor gene is the 'zonation-keeper' of mouse liver. *Dev. Cell*, **10**, 759–770.
  39. Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E. and Lopez-Rios, J. (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell. Sci.*, **121**, 737–746.
  40. Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., Sasaki, Y., Mita, H., Nishikawa, N., Yamaguchi, K. *et al.* (2007) Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, **26**, 4699–4713.
  41. Suzuki, H., Toyota, M., Carraway, H., Gabrielson, E., Ohmura, T., Fujikane, T., Nishikawa, N., Sogabe, Y., Nojima, M., Sonoda, T. *et al.* (2008) Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br. J. Cancer*, **98**, 1147–1156.
  42. Hassan, M.Q., Maeda, Y., Taipaleenmaki, H., Zhang, W., Jafferji, M., Gordon, J.A.R., Li, Z., Croce, C.M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L. *et al.* (2012) miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **287**, 42084–42092.
  43. Kapinas, K., Kessler, C., Ricks, T., Gronowicz, G. and Delany, A.M. (2010) miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J. Biol. Chem.*, **285**, 25221–25231.
  44. Snyder, C.M., Rice, A.L., Estrella, N.L., Held, A., Kandarian, S.C. and Naya, F.J. (2013) MEF2A regulates the Gtl2-Dio3 microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration. *Development*, **140**, 31–42.
  45. Fu, J., Tang, W., Du, P., Wang, G., Chen, W., Li, J., Zhu, Y., Gao, J. and Cui, L. (2012) Identifying microRNA-mRNA regulatory network in colorectal cancer by a combination of expression profile and bioinformatics analysis. *BMC Syst. Biol.*, **6**, 68.
  46. Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L. and Hammer, G.D. (2008) Targeted disruption of beta-catenin in Sfl-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development*, **135**, 2593–2602.
  47. Heikkilä, M., Peltoketo, H., Leppaluoto, J., Ilves, M., Vuolteenaho, O. and Vainio, S. (2002) Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology*, **143**, 4358–4365.
  48. Chen, M. and Hornsby, P.J. (2006) Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. *Horm. Metab. Res.*, **38**, 549–555.
  49. Roy, L., McDonald, C.A., Jiang, C., Maroni, D., Zeleznik, A.J., Wyatt, T.A., Hou, X. and Davis, J.S. (2009) Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis. *Endocrinology*, **150**, 5036–5045.
  50. Parakh, T.N., Hernandez, J.A., Grammer, J.C., Weck, J., Hunzicker-Dunn, M., Zeleznik, A.J. and Nilson, J.H. (2006) Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12435–12440.
  51. Boyer, A., Goff, A.K. and Boerboom, D. (2010) WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends Endocrinol. Metab.*, **21**, 25–32.
  52. Boyer, A., Lapointe, E., Zheng, X., Cowan, R.G., Li, H., Quirk, S.M., DeMayo, F.J., Richards, J.S. and Boerboom, D. (2010) WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J.*, **24**, 3010–3025.
  53. Hernandez Gifford, J.A., Hunzicker-Dunn, M.E. and Nilson, J.H. (2009) Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility. *Biol. Reprod.*, **80**, 1282–1292.
  54. Sun, Z., Cao, X., Jiang, M.-M., Qiu, Y., Zhou, H., Chen, L., Qin, B., Wu, H., Jiang, F., Chen, J. *et al.* (2012) Inhibition of  $\beta$ -catenin signaling by nongenomic action of orphan nuclear receptor Nur77. *Oncogene*, **31**, 2653–2667.
  55. Rajalin, A.-M. and Aarnisalo, P. (2011) Cross-talk between NR4A orphan nuclear receptors and  $\beta$ -catenin signaling pathway in osteoblasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **509**, 44–51.
  56. Lee, S.-O., Abdelrahim, M., Yoon, K., Chintharlapalli, S., Papineni, S., Kim, K., Wang, H. and Safe, S. (2010) Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth. *Cancer Res.*, **70**, 6824–6836.
  57. Kolluri, S.K., Bruey-Sedano, N., Cao, X., Lin, B., Lin, F., Han, Y.-H., Dawson, M.I. and Zhang, X. (2003) Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEK1 in lung cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8651–8667.
  58. Ke, N., Claassen, G., Yu, D.-H., Albers, A., Fan, W., Tan, P., Grifman, M., Hu, X., Defife, K., Nguy, V. *et al.* (2004) Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res.*, **64**, 8208–8212.
  59. Shan, B.E., Wang, M.X. and Li, R.Q. (2009) Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest.*, **27**, 604–612.
  60. Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S. and Russo, G.L. (2012) The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem. Pharmacol.*, **83**, 6–15.



61. Romero, M., Jiménez, R., Hurtado, B., Moreno, J.M., Rodríguez-Gómez, I., López-Sepúlveda, R., Zarzuelo, A., Pérez-Vizcaino, F., Tamargo, J., Vargas, F. *et al.* (2010) Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **627**, 242–250.
62. Larson, A.J., Symons, J.D. and Jalili, T. (2012) Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv. Nutr.*, **3**, 39–46.
63. Takahashi-Yanaga, F. and Kahn, M. (2010) Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin. Cancer Res.*, **16**, 3153–3162.
64. Drelon, C., Berthon, A., Ragazzon, B., Tissier, F., Bandiera, R., Sahut-Barnola, I., De Joussineau, C., Batisse-Lignier, M., Lefrançois-Martinez, A.-M., Bertherat, J. *et al.* (2012) Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS ONE*, **7**, e44171.
65. Nelson, J.D., Denisenko, O. and Bomsztyk, K. (2006) Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat. Protoc.*, **1**, 179–185.





## Supplementary Figures and Tables Legends

**Figure S1. Analysis of potential WNT signalling regulators gene expression on cDNA micro-arrays.** Previously published cDNA micro-arrays were analysed retrospectively for expression of WNT target genes in 6 aldosterone-producing adenomas (APA) compared with 4 normal adrenals (NA). The list of WNT target genes was defined with Pubmed searches and data available on the WNT Homepage (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Genes were classified on the basis of their deregulation (expressed as fold up- or down-regulation), with the highest up-regulation on the left and the highest down-regulation on the right. Limma test and *t*-test were performed to evaluate statistical significance (bottom of the plots). Values in red are significantly up-regulated, values in green are significantly down-regulated.

**Figure S2. A. *SFRP2* expression is correlated with *AXIN2*.** *SFRP2* and *AXIN2* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from 35 APA, 17 NAPA and 7 NA and correlation was analysed by Spearman's test. **B. Plasma corticosterone concentrations are not altered in *Sfrp2* knockout mice.** Plasma corticosterone concentrations were measured in female littermate control (*Sfrp2*<sup>+/+</sup> and *Sfrp2*<sup>+/-</sup>) and female homozygous *Sfrp2* knockout mice (*Sfrp2*<sup>-/-</sup>) at 13 months. Boxplots represent the quantification of corticosterone production in 11 female control and 13 female knockout mice. Statistical analysis was performed by Welch's *t* test. NS: not significant. **C. Genetic ablation of *Sfrp2* results in aberrant activation of  $\beta$ -catenin and ectopic differentiation of zona-glomerulosa cells.** Co-expression of Cyp11b2 (green, a-c) and  $\beta$ -catenin (red d-f), was analysed by immunohistochemistry in wild-type (*Sfrp2*<sup>+/+</sup>), *Sfrp2* knockout (*Sfrp2*<sup>-/-</sup>) and  $\Delta$ Cat mice. Merged pictures are presented in g-i.

**Figure S3.  $\beta$ -catenin knockdown decreases Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation. A-B  $\beta$ -catenin knockdown inhibits accumulation of both  $\beta$ -catenin mRNA and protein.**  $\beta$ -catenin accumulation at the mRNA (A) and protein levels (B) was evaluated in H295R cells transfected with a control siRNA (siGFP) or transfected with a siRNA to  $\beta$ -catenin (si $\beta$ cat) for 5 days and treated 6 hours before harvesting with or without 10 nM Angiotensin II. For western-blot analyses,  $\beta$ -catenin expression was normalised to  $\beta$ -actin. **C-D. Expression of the  $\beta$ -catenin target genes *AXIN2* and *LEF1* is down-regulated by  $\beta$ -catenin knockdown.** *AXIN2* and *LEF1* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from the experiments described in A. **E-F. Expression of the  $\beta$ -catenin target genes *AXIN2* and**



**LEF1 is down-regulated by treatment with PKF115-584.** *AXIN2* (E) and *LEF1* (F) expression levels were analysed by RTqPCR on mRNA from H295R cells that were pre-treated for 24 hours with DMSO (control group), 0.5 or 1.0  $\mu$ M PKF115-584 followed by 10 nM Angiotensin II stimulation alone or in combination with PKF115-584 for 6 hours, before harvesting. **G-J. Expression of *STAR*, *CYP11A1*, *HSD3B2* and *CYP11B1* is not altered by  $\beta$ -catenin knockdown.** Expression of *Star*, *CYP11A1*, *HSD3B2* and *CYP11B1* was analysed by RTqPCR on mRNAs from the experiments described in A. **K. Expression of the  $\beta$ -catenin target gene *Axin2* is induced by Wnt/ $\beta$ -catenin activation with BIO.** *Axin2* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from Y1 cells treated with DMSO (control group) or 500 nM BIO for 3 or 6 hours. **L. *Axin2* induction by BIO is transcriptional.** *Axin2* expression was analysed by RTqPCR on mRNA from Y1 cells treated with DMSO (control group), 500 nM BIO alone or in combination with 100 nM actinomycin D for 6 hours. **M. Accumulation of  $\beta$ -catenin is stimulated by BIO.**  $\beta$ -catenin accumulation (normalised to  $\beta$ -actin) was analysed by western blot with proteins extracted from Y1 cells treated as in K. **N. TOP-FLASH reporter activity is induced by BIO in Y1 cells.**  $3.10^5$  Y1 cells were transfected with 1  $\mu$ g of WNT the reporter plasmids TOP or FOP-FLASH. After overnight serum deprivation, cells were treated for 6 hours with DMSO (control group) or 500 nM BIO in minimum medium. Cells were then harvested and Luciferase activity was assessed. **O-P. Accumulation of NURR1 and NUR77 proteins is decreased by  $\beta$ -catenin knockdown.** NURR1 and NUR77 protein accumulation (normalised to  $\beta$ -actin) was analysed by Western Blot on protein extracts from the experiments described in A. **Q-R. Accumulation of NURR1 and NUR77 proteins is down-regulated by treatment with PKF 115-584.** NURR1 and NUR77 protein accumulation (normalised to  $\beta$ -actin) was analysed on protein extracts from cells treated as in E. Bars in A-M & O-R represent the mean relative quantification of at least 4 individual experiments  $\pm$  standard deviation. Bars in N represent the mean RLU value of at least 3 individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. All statistical analyses were performed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ; NS: Not significant.

**Figure S4. Identification of two putative LEF/TCF binding sites in the promoter of *CYP11B2*.** The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *CYP11B2* genes were aligned with Genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative LEF/TCF sites, which were identified on the basis of similarity to the published consensus, are highlighted in purple. NGFIB (NBRE, Ad, Sf-1) sites are highlighted in orange. Pink



arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site, pictured as a black arrow.

**Figure S5. Identification of two putative LEF/TCF binding sites in *NURR1* promoter.**

The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *NURR1* genes were aligned with Genomatix. Capital letters represent conserved bases. The two putative LEF/TCF sites, which were identified on the basis of their similarity to the published consensus, are highlighted in purple. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.

**Figure S6. Identification of four AP1 sites in *NUR77* promoter.** The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *NUR77* genes were aligned with Genomatix. Capital letters represent conserved bases. The four published AP1 sites are highlighted in blue. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.

**Figure S7. Alignment of mouse and human *CYP21* promoters.** The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *CYP21* genes were aligned with genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative LEF/TCF and NGFIB (NBRE, Ad, SF-1) binding sites, which were identified on the basis of their similarity to published consensus sequences are highlighted in purple and orange, respectively. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.

**Figure S8. Identification of one putative LEF/TCF binding site in human *AT1R* and mouse *At1a* promoters.** The promoters of Homo sapiens (hs, *AT1R*) and mus musculus (mm, *At1a*) *AT1R* genes were aligned with genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative LEF/TCF binding site, which was identified on the basis of its similarity to the published consensus is highlighted in purple. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.

**Figure S9. Identification of one putative Ap1 binding site in mouse *At1b* promoter.** The promoters of Homo sapiens (hs, *AT1R*) and mus musculus (mm, *At1b*) *AT1R* genes were aligned with genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative Ap1 binding site, which was identified on the basis of its similarity to the published consensus is highlighted in purple. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.



**Figure S10. Plasma corticosterone concentration is not altered by quercetin.** Plasma corticosterone concentrations were measured in a cohort of 10 month-old female  $\Delta$ Cat mice that were either fed a standard diet (n=6) or a 0.2% quercetin-enriched diet (n=6) for three months. Bars represent the mean relative quantification of 6 individual hormone concentrations  $\pm$  standard deviation. NS: Not significant in unpaired Student's *t* test.

**Figure S11. Analysis of genomic DNA methylation in the regulatory regions of *SFRP2*.** CpG methylation was analysed by pyrosequencing on the genomic DNA of 11 APA, 4 NA and 15 NAPA after bisulfite conversion. Boxplots represent the distribution of the percentage of methylation for each CpG and each group of patients. Top panel represents the 21 upstream CpGs (-392,-243). Bottom panel represents the 34 downstream CpGs (+48,+284). The cartoon shows a schematic localisation of each CpG on the *SFRP2* gene. CpGs in red have significantly increased methylation in APA compared with NAPA; CpGs in blue have significantly decreased methylation in APA compared with NAPA. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ .

**Figure S12.  $\beta$ -catenin knockdown increases *CYP17* expression and DHEA production. A.  $\beta$ -catenin knockdown increases *CYP17* expression.** *CYP17* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from H295R cells transfected with a control siRNA (siGFP) or a siRNA to  $\beta$ -catenin (si $\beta$ cat) for 5 days. **B.  $\beta$ -catenin knockdown increases DHEA production.** Basal and angiotensin II-induced DHEA concentrations were measured on the culture medium from H295R cells that were treated as in A. **C.  $\beta$ -catenin knockdown decreases cortisol production.** Basal and angiotensin II-induced cortisol concentrations were measured as described in B. Bars in A represent the mean quantification of at least 4 individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. Bars in B-C represent the mean DHEA (B) or cortisol (C) concentration (normalised to protein content) from 4 individual experiments performed in triplicate  $\pm$  standard deviation. All statistical analyses were performed by Student's *t* test \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; NS: Not significant.

**Table S1. Baseline characteristics in patients of HEGP/COMETE and COCHIN/COMETE cohorts. A.** Biological data of patients in the cohorts used for our experiments. **B.** Table summarizing the qualitative analysis of  $\beta$ -catenin localisation in APA samples, expressed as a percentage of cells with membrane, cytoplasmic and/or nuclear  $\beta$ -catenin accumulation. This table also shows the mutational status for *KCNJ5* and *CTNNB1* in





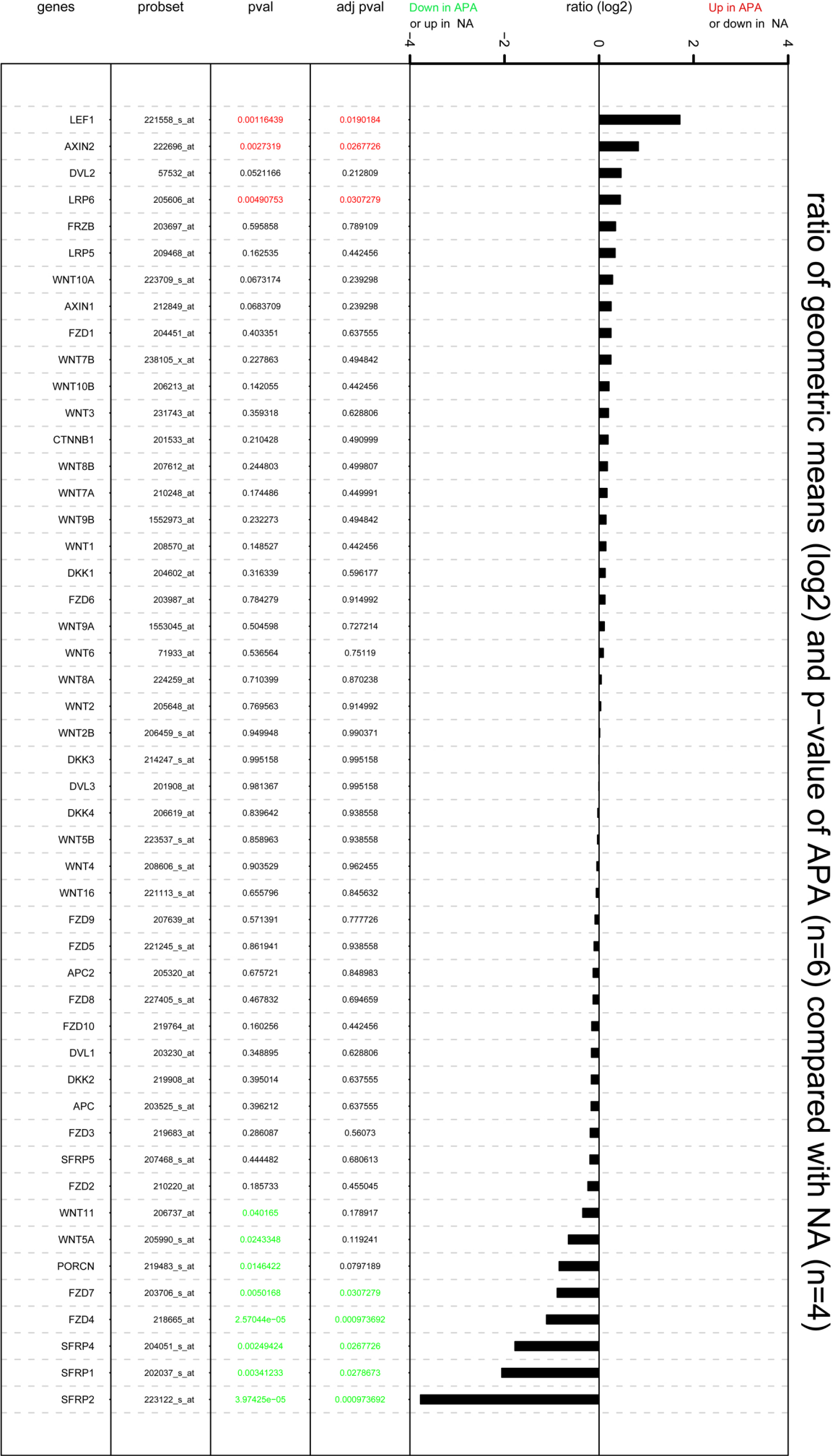
the HEGP/COMETE cohort and identifies those samples that were used for RTqPCR and DNA methylation analyses. ND, not determined; Y, Yes; N, No.

**Table S2. Sequences of primers used for RTqPCR.**

**Table S3. Taqman Gene expression assays probes used for RTqPCR.**

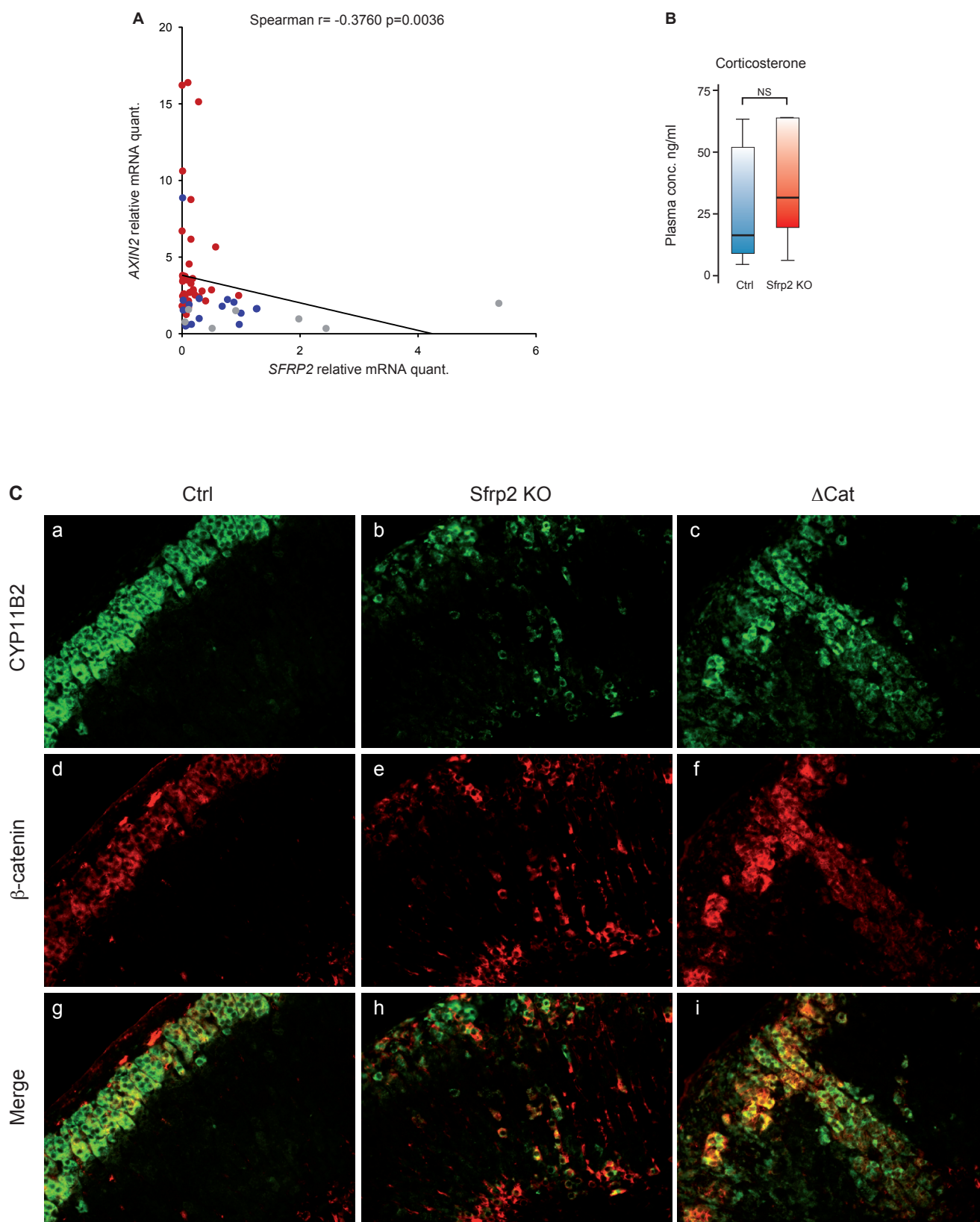
**Table S4. Sequences of primers used for *homo sapiens* (hs) and *mus musculus* (mm) ChIP analysis.** The DNA binding sites analysed are indicated in brackets.





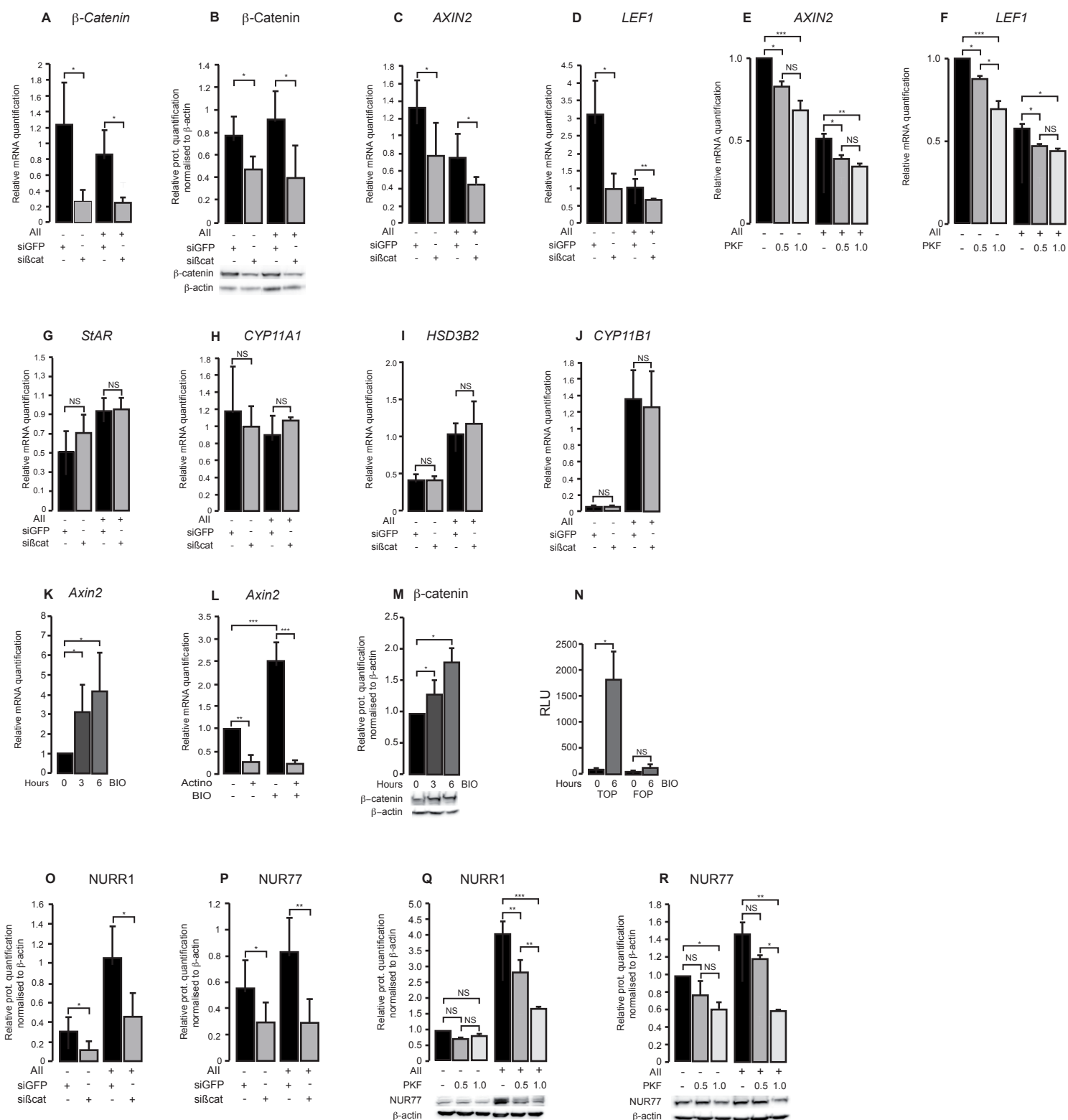
Supplementary Figure 1





Supplementary Figure 2.





Supplementary Figure 3.





## CYP11B2/Cyp11b2

```

-1330 cagaaagtgtatttgatgatcatagttatgtatatgtgaaatgaaggacagcaatgatgcaagggATGGG hs
-1120 -----ATGGG mm

                                     Lef
-1325 TGAGtGgaaTTaaaaatatctTATtAtTtAtTtTtttgAGaTggagTcttgctTtgctgCCCAGgTtGG hs
-1050 TGAGgGcttTTggggtaggagTATaAaTgAccTtaaagaAGcTacctTgggaggTctgcaCCCAGcTgGG mm

-1255 agtgcagtggggatgatctcaactcactgcaacctccgcctccttgattcaagcattcatcttgactcagc hs
----- mm

*****
-904 aactctagggcaaccactaaagaagtggagaccagcctctagaaaaaaaaaaaaaaggaaattagcta hs
----- mm

                                     Lef / Nbre1
-834 tcaagccacgaaaagaaatggaggaaaccttaaacgcataattactaactgagatacgtcactttgaaaagg hs
----- mm

-764 ctacaaacggtgtcattccaactatacaacattttggaaaaggccaaagcatggtgatgataaaaagatc hs
----- mm

-694 ggagatgtcagggactggggcaggagGGGATgagCAGGCAgagcacaggttttcttttcctcttttaaga hs
-738 -----GGGATactCAGGCA----- mm

-624 cagtgaataactcctAGGATCCTgCaaGGAGGGAtacaaAttAcatacatttgTCaaAacccAcagcaT hs
-724 -----AGGGTCCTtCtGAGGGAatgtcAacAatcAacagacTCagAtgtgAtgatcT mm

*****

-440 gggcaggggtacgtggacattttcTGcAgttTTTGaTCaaTTTgCAatgAactAAaTCgtggTaT-- hs
-382 -----TGaAgcTTTGtTCctTTTtACAGaaActgAAATCaagctTgTtt mm

-372 -----A hs
-337 ggggaaaaatacaatgcttttataaacgttctagtccttagatttattttcactaaagccacaaaaaaaA mm

                                     Sfl
-371 AAAaTaAAGTCTATTAAAAGAATCCAAGGctccCTcTcAtcTCacgAtAAGATAAAGtccCCATCCaTtT hs
-267 AAAAccAAGTCTATTAAAAGAAACCAAGGtcttCTaTgAtaTCttcAaAAGAgAAAGgatCCATCCgTcT mm

                                     Sfl
-301 TaCTccTctCAGCcctGGaGAAagGAGAGgccagGTCCcCacCaCctTCcACCagcatggACCCccagTCC hs
-197 TcCTttTtcCATCtagGGGAGcgaGAGAGt---GGTCTCtgCccCcTcTACcCtaggcaACCCaatcTCC mm

                                     NRBS
-231 agaccccACg-----CCTttTCTCAGcaTCctcagACcAGCAGGactTGCAGcaaTggGgaAttaGGcac hs
-130 tatgtggACactataCCTgcTCTCAGttTCTaaccACTAGCAGGctgTGCAGgtgTtaGagAgatGGtca mm

                                     Ad5
-166 ctgActtctccttcatCTaCcttTGgCtGggGgcCtCCAGcCtTGACCTtcGCTCtgAgaGTCACgCA hs
-60 tatA-----CTtCtacTgaCaGttGagCccCAGtCaTGACCagaGcCaaAt-GTCTCAGaCA mm

                                     Ad1
-96 gGTCCAGaGcCAGTT-CTcCCATGACGTGATatGTttccagagcagGttcc--TgGGtgAGATAAAAGGa hs
-3 aGTCCAGgGaCAGTTtCTtCCATGACGTGATtaGTcgaacagtgcAGgatattTaGGtaAGATAAAAGGc mm

-29 TtTGggCTGAACAgggtggagGGAGcATtGgAATGGCaCTCAGGGcaAagGCAGAgGTGTGCgTGGCAgc hs
+68 TgTGaaCTGAAGaAca-----GGAGgATgGcAATGGCtCTCAGGGtgAcaGCAGAtGTGTGGcTGGCAag mm

+42 gCCCTGGCtGTcCTGCAaAGGgCaGGGCACtGGGCACtAgaGCcgCtCgGGCCCCtAgGACggTGcTg hs
+132 aCCCTGGCaGTgCCTGCACAGGaCaGGGCACtGGGCACcAcgGCaaCaCtGGCCCCaAaGACccTGCaG mm

                                     Sfl

```

Supplementary Figure 4.



## NURR1/Nurr1

```

-300 -----G TTGCACCTC CCCACaTGTG AGcggccgag hs
-250 cttttccggt caagcttttG TTGCACCTC CCCACgTGTG AGgacgcaag mm

-269 ccgCTGcGcG GgGcGcAGGGG CttcggggaA aGTGaAGtGT cGCgaCgCtg hs
-200 gt-CTGgGgC GgGgGgAGGGG C-----A gGTGgAGcGT aGCatCaCca mm

-219 CGGgCTgCgC aGACCTGGG- ---AGAgGTC ACACcTCTTT CGGAAAAAAA hs
-159 CGGaCTtCaC gGACCTGGGt tgcAGAAgTC ACACtTCTTT CGGAAAAAAA mm

-173 AAAAgaaaag aaaaaaaaca ccaaaaaCCA CCCAAGctGG CTACCAAGGT hs
-109 AAAAat---- -----CCA CCCAAGtgGG CTACCAAGGT mm

-123 GAACgcagag cgGTTCCcAC CTTAAAATCg GCCctgcTCG TGACGTCAGG hs
-80 GAACc----- --GTTCCcAC CTTAAAATCa GCCCagTCG TGACGTCAGG mm

      Lef
-73 TCGGAAATAT ACCAAAGCGA GCGCGGGCCA GGAGTCCaGG GAGCGCGGCa hs
-37 TCGGAAATAT ACCAAAGCGA GCGCGGGCCA GGAGTCCgGG GAGCGCGGCg mm

      Lef
-23 GCgCGGCgAT TGGgCgGCGG GCCGCTGACG CGcGCTGACG CGCGgAGACT hs
14 GctCGGCgAT TGGaccGCGG GCCGCTGACG CGgGCTGACG CGCGcAGACT mm

      Lef
28 TTAGGTGCAT GTTGGCAGCg GCAGCgCaAG CCACATAAAC AAAGGCACAT hs
64 TTAGGTGCAT GTTGGCAGCa GCAGCtCgAG CCACATAAAC AAAGGCACAT mm

78 TGGCGGCCAG GGCCAGTCCG CCCgGCGGCT Cgcgcacggc tccgcggtcc hs
114 TGGCGGCCAG GGCCAGTCCG CCCcGCGGCT Cgcacag-- ----- mm

```

Supplementary Figure 5.



## NURR77/Nurr77

```

-400 atcctcatcc ggggaagccc cgCGGcCgCG tcTcTACAgC gCCCCtTCtc hs
-400 ----- --CGGgCaCG gaTtTACAaC aCCCCcTCct mm

-350 gggctctggc cctcccgtG GTTATTctGG ACctgGGGgC CCccagctgg hs
-372 cctggtc--- -----G GTTATTtCGG ACCccGGGaC CCgat----- mm

-300 gaCCCGaGTC CGGtgcGGgG AGCCTAGTGG GcCTGGgAGC TgCTATtTTT hs
-339 --CCCGgGTC CGGcttGGtG AGCCTAGTGG GtCTGGaAGC TaCTATaTTT mm

-250 AGCGGGCGCg GCGGGCGcGA GGAgc-CTAT TTATAGATCA AACAAATCCGC hs
-291 AGCCGGCGCa GCGGGCGaGA GGAaaaCTAT TTATAGATCA AACAAATCCGC mm

      AP1                      AP1
-201 GCTCCCTGCG TCAATGGAAC CCCGCGTGCG TCACGCGCGC AGACATTCCA hs
-241 GCTCCCTGCG TCAATGGAAC CCCGCGTGCG TCACGCGCGC AGACATTCCA mm

-151 GGCCCCCCT CcTCGCCCCG CCCCCTCGGG CTCCCCGgg- CCGCaCCTCC hs
-191 GGCCCCCCT CtTCGCCCCG CCCCCTCGGG CTCCCCgtcc CCGCgCCTCC mm

-102 cCCTGGCCGC CTCCCGCCGG AACCgCaCCG CCCCCCGCGC CCTTGtATGG hs
-141 tCCTGGCCGC CTCCCGCCGG AACCgCgCCG CCCCCCGCGC CCTTGtATGG mm

      AP1
-52 CCAAAGCTCG aCGGGCggcc TGCGTCAGTG GCGCCCCGC CCCTCccgT hs
-91 CCAAAGCTCG cCGGGCegtG TGCGTCAGTG GCGCCCCGC CCCTCtCCaT mm

      AP1
-2 GCGTCACGGA GCGCTTAAGA gGaGGGTCGG GCTCGgCcGG GGAGtCCCAG hs
-41 GCGTCACGGA GCGCTTAAGA tGtGGGTCGG GCTCGcCaGG GAGcCCCAG mm

```

Supplementary Figure 6.



# CYP21/Cyp21

-709	-----	-----	-----CAaAC	CAGCTCaAGG	TGggCTGTtt	hs
-735	gccctcaggg	gtcttgtacc	ttggaCAGAC	CAaCTgAgGC	TGacCTGTgg	mm
-684	tcctttcaac	ca-----	-----	-----	-----	hs
-685	ttaccacaca	caagcacaac	accctctgcc	atgccccacc	cctacccaga	mm
-635	catcaaacca	aagggaagtc	taaCaaagaa	ttgcacaagg	agccaggtga	hs
	Lef	Lef	Lef			mm
-671	-----	-----	-----	----AAGaAA	GGTGCTcctg	hs
-585	ctcatgtctg	cattccaagc	tatttgggga	gctgAAGgAA	GGTGCAaagt	mm
-655	gtggctaag	gtacatatc	gacagctaga	tttccaggct	ggaatcctgc	hs
-535	ttctgcctgt	ctgagctaca	cggtgagttc	aaggTacc--	-----	mm
				Sf-1		
-605	cctccacaac	atgcgaacaa	taccctgtgt	gcatatagag	catggctgtg	hs
	-----	-----	-----	-----	-----	mm
-555	aagagttgag	tgagtgccca	caaagcactt	agagcagtgt	ctggtacatg	hs
	-----	-----	-----	-----	-----	mm
-505	ctattactcc	gcagcgggaa	accacttcct	cctttgtctt	CTGGGCAcT	hs
-497	-----	-----	-----	-----	CTGGGCAaC	mm
-455	TtGTGAGTga	aaggaggcac	taataacaat	cacactggga	tacctgtata	hs
-487	TaGTGAGgct	ctttttc---	-----	-----	-----	mm
-405	tactggaatg	ccccaggcaa	accaggctta	aactgtatta	ctctatctgt	hs
	-----	-----	-----	-----	-----	mm
-355	agcttAAACT	AACAAaCaac	ccacacaaat	cacattttgt	tcttcaggcg	hs
-470	-----AAACT	AACAAaagag	ggtctaggac	tgtggatgca	gctggcagtg	mm
-298	-----	-----	--AAGGCcTA	TTaGGCAGgG	ACTGCCaTTt	hs
-375	atcaataaaa	tataataccc	aaAAGGCgTA	TTgGGCAGaG	ACTGCtATTC	mm
	Lef					
-270	tctctctg--	---AGAcAA	catCATgCCA	GTaAaCTGGc	CCAcGGtGgG	hs
-325	atctcttttc	tctAGAcAA	atgCActCCA	CTcAgCTGGT	CCAaGGgGaG	mm
					Sf-1	
-225	GTggcagagg	gagaggggcc	aggtgggggc	ggacactatt	GCCTgCacaG	hs
-275	GTatggtggg	aggggccggc	tccagtggac	tctcc----	GCCTaCttgG	mm
-175	tTGAtgtgGA	accAGaAAgC	TGACTctgga	tgcaggaaaa	AGGTCAGGGT	hs
-230	cTGAaacaGA	gttAGgAAaC	TGACTgcgat	acagag----	AGGTCAGGGT	mm
					Nbre	
-125	tgcattTCCC	TTCCCTTgCTT	CTTGATGGgt	gatcaattTT	TTTGAAatAC	hs
-184	cttgcaTCCC	TTCCCTTtCTT	CTTGATGGat	ggtccca-TC	TTTGAtccAC	mm
		Nbre			Lef	
-75	gGAcgtcCCA	AGGCcAATGa	GactgGTGtc	attccagaaa	agggccactc	hs
-135	aGAttctCCA	AGGCtgATGg	GgactGTGcc	aatgtgaaaa	catactgttc	mm
-25	tgtgggcggg	tcggtgGGAG	GGtACCTGAA	GgtggGGTCA	agggaggccc	hs
-85	tgtgttgga	aca---GGAA	GGgACCTGAA	GcaaaGGTCA	gagc-----	mm
				Lef Nbre		
26	caaaacagtc	taCACAGCAG	gAgggAtGgC	TGGgGcTctt	GaGCTATAAg	hs
-44	-----	--CACAGCAG	aAcaaAgGaC	TGGaGtTgg-	GgGCTATAAA	mm
			Lef			
76	tGGCacc-TC	AGGGCCCTGa	cgggcgtctc	-GCCATGCTG	CTcCtgGGcC	hs
-7	agGCcataTC	AGGGCCCTGc	acaagtgctg	gGCCATGCTG	CTaCctGGgC	mm
	Nbre					
124	TGCTGCTGct	gctgcccttg	ctggetggcg	cccgcctgct	gtggaactgg	hs
44	TGCTGCTG--	-----	-----	-----	-----	mm

Supplementary Figure 7.





# AT1R/At1a

-594	TGgtTTTGT	ATCAGgGtgA	TaCTGGCCTC	aTagcatga-	GttGggag-a	hs
-854	TgagTTTGT	ATCAGaGTaA	TtCTGGCCTC	gTgatacact	GcaGaatgta	mm
-546	-----	-----	-----	-----	-----	hs
-804	tttcccttt	cctttccttt	cctttccttt	cctttccttt	cctttccttt	mm
-546	-----	-----	-----	-----	-----	hs
-754	cctttccttt	cctttccttt	cctttccttt	cctctcctct	cctctcctct	mm
-546	-----	-----	-----	-----	-TCaTcCTTa	hs
-704	cctctcctct	cctctcctct	cctctcctct	cctttccttt	cTcTtTCTTt	mm
-537	CTcTCTaTt	TTTtgaaga	gtttgtga--	-----	-----	hs
-654	CctTCTcTc	TTTctttctt	ttcttccttc	cctttctcct	tccttccttc	mm
-509	-----	-----	-----	-----	-----	hs
-604	cctttcttct	ttctttcttt	cctttcttct	ttctttcttt	ttttctttct	mm
-509	-----	-----	Lef	-----	-----	hs
-554	ttctttcttt	ctaatttAGA	ATTGAgtTcA	TTTtgTtcTc	AAATATTTtg	mm
-476	TGggt-----	-----	-----	TTT	TAAAAAcacat	hs
-504	TGctatTTTT	ttggcagtct	gtttttaTTT	TAAAAATA---	-----AATG	mm
-448	CAaCTTGgGt	agCaTGTcca	aTAGGAacAA	aTGAgTgTCC	acccTTgaAt	hs
-463	CAGCTTGaGc	caCgTGTAaa	cTAGGAggAA	cTGataaTcT	tttaTtTtAc	mm
-398	ttcatAACcC	TGgAATTAAT	CCATGtaATc	TaTgATCCAC	AaCtgtatta	hs
-413	-----AACtC	TGaAATTAAT	CCATGccATa	TgTaATCCAC	Agcacaggcc	mm
-348	cCAAAGTTCG	AGTTACTCAT	AGGAAAGAgA	AaGaAGTTcT	CTAATTCGTC	hs
-368	tCAAAtTTtG	AGTcAgcCac	AGcGAAGA-A	AgGgAGTTcC	tTAATTCaTc	mm
-298	CTTAAAGTT	TTCCAAGtTc	agaaaaaaaa	aaTgTtgAAG	aacAcgAaTc	hs
-319	CTTAAAtTT	TTCCAAGaTt	ttttttttct	tcTtTctAAG	tgaAgcAtTt	mm
-248	tcCgcaGgaa	atGaTacTcc	tG---TACcC	CCAgCTCgCT	CtccCTcacg	hs
-269	atCttgGagt	caGttcATGt	gGcctTACgC	CCAcCTCcCT	CcatCTtcaa	mm
-201	acCcctcGct	----AgGcGG	GgTTCgGGAC	CAGgTGAAcG	ctgATCTGat	hs
-219	caCttcaGgc	tgggAtGtGG	GaTTCaGGAC	CAGcTGAgCt	tgGATCTGga	mm
-155	AGttgACAcG	GGAcGACTgt	ggcatcatcc	ttgctgCCGT	CAatAtCccG	hs
-169	AGggcACAtc	ggtgactggc	agcaGGAag	acT---CCGT	CAGaGaCtgG	mm
-105	AGAGGGAGga	GGTTGGgCcG	ggaGGGTCTC	c-----	----CGGGGC	hs
-122	AGAGGGAGag	GGTTGGaCaG	a--GGGTCTC	ggggcggggc	ggggCGGGGC	mm
-68	GGGGCGgaGG	AGGAGgGaAt	gcaaaacaGa	gcctcgtccc	cGGAACCCaa	hs
74	GGGGCGagGG	AGGAGtGcAa	agccttagGg	tt-----	-GGAACCTgc	mm
-18	GaAGcAGCAA	CGcCCcTcA-	--CTATAAAAT	tcGGAgcTGC	CTCctcGCcA	hs
-33	GgAGtAGCAA	CGtCCcCta	ggCTATAAAAT	atGGAagTGC	CTCgctGctg	mm
30	ATgattccag	cgcctgacag	ccaggaCcCC	AGGCAGcAGc	GAGtGACaGG	hs
18	AT-----	-----	-----CgCC	AGGCAGttGg	GAGgGACTGG	mm
80	AcGtctggac	CgGcgCGCCg	CtaG-----	-----c	AGCTcTGccG	hs
44	AtGatgctgt	CtGgcCGgag	aggactcgag	gcttgagtcc	tgggtCCaCgg	mm
115	GGcCGCgGcG	GTGateGAtG	gggagcggct	ggag		hs
94	GtCGCTgGGg	tGGGtCGCtG	gGGTGgct--	----		mm

Supplementary Figure 8.



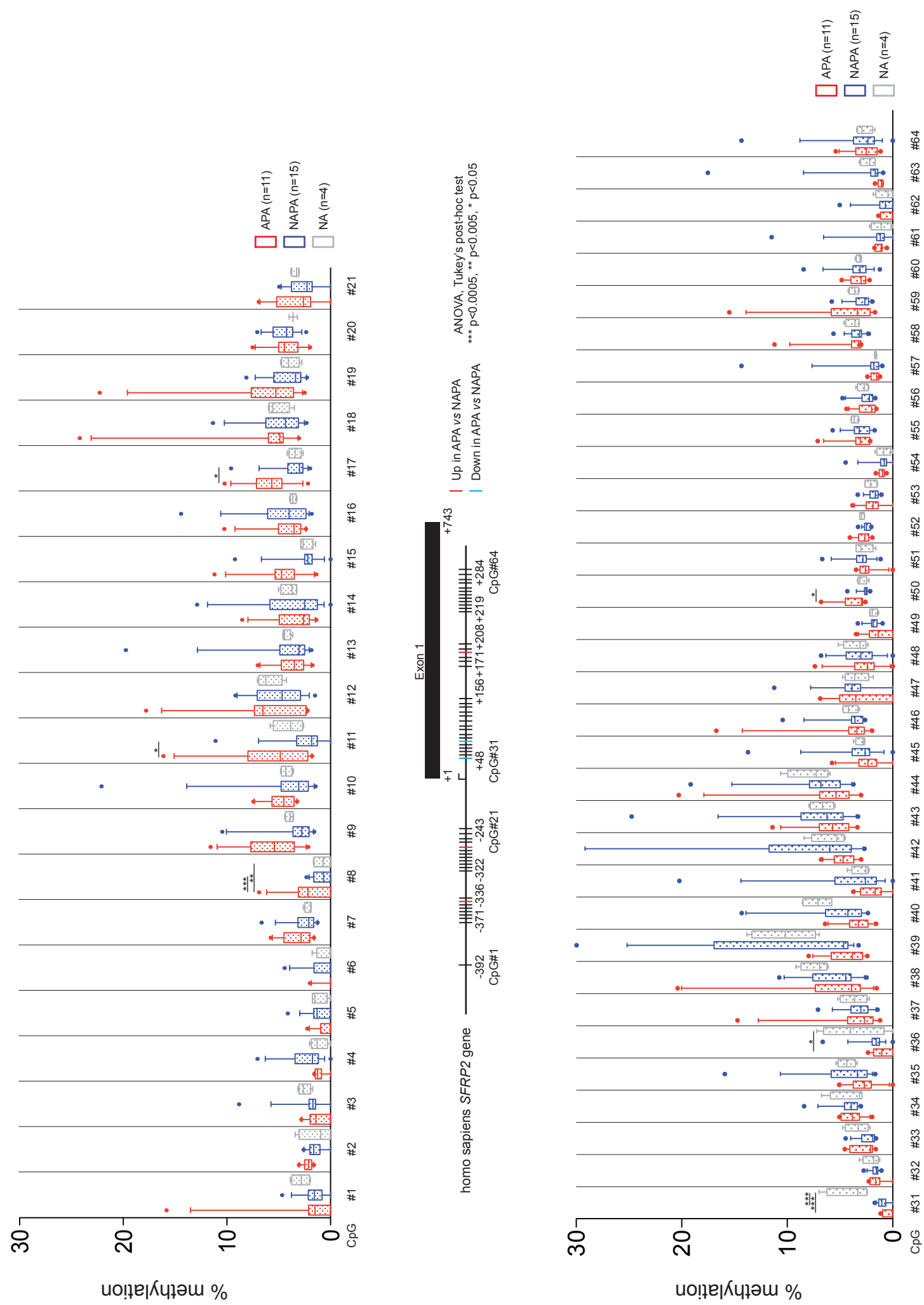
# AT1R/At1b

-587 gttatcaggg tgatactggc ctcatagcat gagttgggag atcatcctta hs  
 -628 -----  
  
 -537 ctcttctatt ttttgaaga gtttgtgaag aattgatatt atttcttctt hs  
 -628 -----  
  
 -487 taaatattta ttgGGTtttTt AaAatACATT ttTaAaaTGC aAcTtgGgTA hs  
 -628 ----- ---GGTAcTT AtAtgACATT acTgActTtC tAaTacGtTA mm  
  
 -437 gCAtGtccAa TAGg----------AACAAa hs  
 -591 aCAaGaatAg TtGtaatgaa tgatattcaa gaagcatttt aaaaAatAgA mm  
  
 -417 TGAgtgTCCa CCCTTgaATT tcAt--AACC CTggAATTAA TCcATGtaAT hs  
 -541 TGAaaaTctA CCCTTtcATT ctAtgcAACC CTatAATTAA TCaATGccAT mm  
  
 -369 CTAtGATCCA CAaCTGtatT acCAAaGTTc GAgTtactca taggAAAgAg hs  
 -491 CTAcGATCCA CAgCTGcacT gtCAAAtTTt GATTagtatt at--AAAtAc mm  
 ap1  
  
 -319 AAaGAAGtTC tCTAATTCgT CCTTAAaAGT tTTccaAgtT cAGaAAaAAA hs  
 -443 AAgGAAGcTC -CTAATTCaT CCTTAgAAGT gTTtttAacT tAGtAAtAAA mm  
  
 -269 aaaTgTtgAA GaacAcgAA- ----- hs  
 -394 ggagagctAg ctggtgaagg aagaaagaaa caagcaaaca aagggggggg mm  
  
 -250 ----- ----TCTCCg caGgaaatGa TacTcctGTA Cc---CCCAG hs  
 -344 gaaggaatat tttcTCTCCa aAGtAAATaA TgtTgtctgA tCccaCaCAG mm  
  
 -217 CTCgCTCtCc CTcacgaccC CTCgCTAGGc GggGTtcGGg aCCAGgTgaA hs  
 -294 aTCcCTCtCc CTtcaagaaC CTCtCTAGGa GatGTagGGt tCCAGtTcca mm  
  
 -167 cGctgatCTG a-----TAG tTgACACgGg AcgActgTGG caTCaTCCTT hs  
 -244 aGtgagcCTG tatcaagTAG gTGACACtGa AgtACatTGG agTCcTCCTT mm  
  
 -123 GCTgccGTCA atAtCccgag AGGGAGgaGG ttGGGcCgGG AGGGTCTccc hs  
 -194 GCcttaGTCA gaATCtgtca AGGGAG---- --GGGtCaGG AGGGTCTtta mm  
  
 -73 GGGGCGGGGc ggaGGAGGAG gGaAtgcaaa acaGagcctc gtccccGGAA hs  
 -150 aGGcgGGGcg aGAaGgGaAG GcAAgcccAg ACt----- ----CGGA mm  
  
 -23 CCCAAGAAgC AGCAACGCCC CTcactata- -AAtTcGgAG cTGcCTCCtC hs  
 -112 CCCAAGAAaC AGCAACGCCC CTttgctgta tAAAtTtGtAG CTGtCTCCgC mm  
  
 26 gccAATgatt cCagcgctg aCAGCCaGGA cCCCAGGCAG CAGcGAGTGA hs  
 -62 taggATtaca gCtgcagg-- -CAGCCtGGA tCCCAGGCAG CAGgGAGTaa mm  
  
 76 CAGgacgtct ggAccggcgc gc----- ----CGCtAG CAGCtCTGcc hs  
 -15 CAGagaccag acAagacacg cacagcctct ccagCGCcAG CAGCaCTGta mm  
  
 114 gggccgcggc ggtgatcGAT GGGGAGCgGC tggag----- ----- hs  
 36 ----- --GAT GGGGAGCaGC caagaggcgt gaaagaagcc mm  
  
 148 ----- hs  
 70 cggagctggg gcaccgtgca cgggtgagtc gcg mm

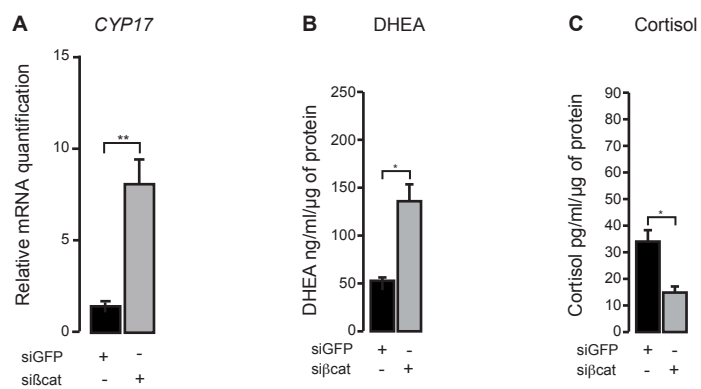
Supplementary Figure 9.



Supplementary Figure 10.



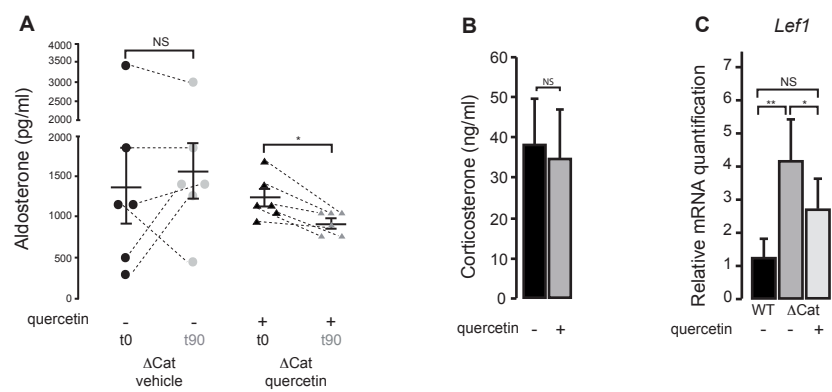




Supplementary Figure 11.







Supplementary Figure 12.



**A**

Variable	HEGP/COMETE Cohort, n= 31			COCHIN/COMETE Cohort n = 17
	Preadrenalectomy	Postadrenalectomy	P	Preadrenalectomy
age, y	38±8			47,5±9
Sex (male/female), %	45/55			27/73
SBP, mm Hg	152.7±25.0	135.5±19.3	0.0088	
DBP, MM Hg	90.9±13.1	87.3±11.6	0.3005	
Duration of hypertension, y	8±8			
Serum K+ level, mmol/L	3.3±0.4	4.1±0.3	<0.0001	
Urinary aldosterone, mean (range), nmol/day	118.6 (18.0 to 575.0)	24.3 (10.0 to 46.0)	<0.0001	
Active renin supine, mean (range), mU/L	2.9 (0.0 to 9.4)	15.2 (2.1 to 83.0)	<0.0001	4.74 (2 to 10)
aldosterone supine, mean (range), pmol/L	881.4 (76.0 to 2523.0)	179.6 (33.0 to 638.0)	<0.0001	729 (207 to 1290)
ARR, mean (range)	380.4 (51.0 to 1218.0)	18.2 (0.0 to 71.0)	<0.0001	
Tumor size, mean (range), mm	16 (5 to 50)		<0.0001	17 (11 to 25)

**B**

Patient	β-cat activation	β-cat localisation			KCNI5 mutation				CTNNB1 mutation	qPCR	Methylation
		Mb	Cyto	Nucl	Mut KCNI5	G151R (G/C or G/A)	T158A (Y/N)	L168R (Y/N)			
07H1821	Neg	100%			N	N	N	N	ND	Y	
07H3802	Neg	100%			Y	G/A	N	N	ND	Y	
07H3045	Pos	60%	40%		Y	G/C	N	N	N	Y	
07H2542	Pos			80%	N	N	N	N	N	Y	
07H2414	Pos			15%	N	N	N	N	N	Y	
04H3014	Pos			100%	ND	ND	ND	ND	ND	Y	
06H1194	Neg	100%			N	N	N	N	ND	N	
07H879	Pos	40%		60%	Y	G/A	N	N	N	Y	
07H1005	Pos	90%		10%	N	N	N	N	N	Y	
05H2197	Pos	10%	50%	40%	N	N	N	N	N	Y	
05H998	Pos			90%	N	N	N	N	N	Y	
05H1810	Pos	90%	10%		N	N	N	N	N	Y	
05H3987	Pos			90%	N	N	N	N	N	Y	
05H4008	Pos			80%	N	N	N	N	N	Y	
05H255	Neg	95%	5%		Y	G/A	N	N	ND	Y	
04H1594	Neg	100%			Y	G/C	N	N	ND	Y	
03H2897	Pos			90%	Y	G/C	N	N	N	Y	
03H2174	Pos	70%	30%		Y	G/A	N	N	N	Y	
03H1984	Neg	100%			Y	N	N	T/G	ND	Y	
03H1967	Neg	100%			Y	G/A	N	N	ND	N	
02H3989	Neg	100%			N	N	N	N	ND	Y	
02H2677	Neg	100%			Y	G/A	N	N	ND	Y	
01H6982	Pos			100%	Y	N	N	T/G	N	Y	
02H3170	Pos			100%	Y	G/A	N	N	N	Y	
02H2630	Pos			100%	Y	G/A	N	N	N	Y	
05H132	ND				N	N	N	N	ND	Y	
03H4079	Pos	90%	10%		Y	G/C	N	N	N	Y	
04H767	Pos	5%	40%	55%	N	N	N	N	N	Y	
03H880	Pos	20%	60%	20%	N	N	N	N	N	Y	
04H2927	Pos	90%	10%		Y	N	N	T/G	N	Y	
04H1326	Pos	70%	30%		ND	ND	ND	ND	ND	Y	
c1	Neg	ND	0%	0%					N	Y	Y
c2	Pos	ND	20%	5%					N	Y	Y
c3	Pos	ND	40%	3%					N	Y	Y
c4	Pos	ND	30%	4%					N	N	Y
c5	Pos	ND	60%	10%					N	N	Y
c6	Pos	ND	15%	0%					N	N	Y
c7	Pos	ND	30%	10%					N	N	Y
c8	Pos	ND	40%	2%					N	N	Y
c9	Pos	ND	25%	2%					ND	Y	Y
c10	Pos	ND	15%	0%					ND	Y	Y
c11	Pos	ND	30%	0%					ND	Y	Y
c12	Neg	ND	ND	ND					ND	N	N
c13	Neg	ND	ND	ND					ND	N	N
c14	Pos	ND	ND	ND					ND	N	N
c15	Neg	ND	ND	ND					ND	N	N
c16	Neg	ND	ND	ND					ND	N	N
c17	Pos	ND	ND	ND					ND	N	N

Supplementary Table 1.



	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>Human NURR1</b>	5'-TGCCTGGCTGTTGGGATGG-3'	5'-GCTGGATATGCTGGGTGTC-3'
<b>Human CYP21</b>	5'-ACCTCAGTTTCTCCTTTATTGC-3'	5'-AGAGCCAGGGTCCTTCAC-3'
<b>Human AT1R</b>	5'-TCTCAGCATTGATCGATACC-3'	5'-TGACTTTGGCTACAAGCATT-3'
<b>Human StAR</b>	5'-ATGAGTAAAGTGGTCCCAGATG-3'	5'-ACCTTGATCTCCTTGACATTGG-3'
<b>Human CYP11A1</b>	5'-GAGATGGCACGCAACCTGAAG-3'	5'-CTTAGTGTCTCCTTGATGCTGGC-3'
<b>Human HSD3B2</b>	5'-TGCCAGTCTTCATCTACACCAG-3'	5'-TTCCAGAGGCTCTTCTTCGTG-3'
<b>Human CYP11B1</b>	5'-GGTTTGCCAGGCTAAGC-3'	5'-CAAAGTCCCAGAGGACAG-3'
<b>Human CYP17</b>	5'-AGCCGCACACCAACTATCAG-3'	5'-TCACCGATGCTGGAGTCAAC-3'
<b>Human PPIB</b>	5'-TTTCATCTGCACTGCCAAGA-3'	5'-TTGCCAAACACCACATGCT-3'
<b>Mus musculus Axin2</b>	5'-GCCGATTGCTGAGAGGAACTG-3'	5'-AAAGTTTTGGTATCCTTCAGGTTTCAT-3'
<b>Mus musculus At1ar</b>	5'-TCACCTGCATCATCATCTGG-3'	5'-AGCTGGTAAGAATGATTAGG-3'
<b>Mus musculus At1br</b>	5'-TCACCTGCATCATCATCTGG-3'	5'-AGCTGGTGAGAATAATAACG-3'
<b>Mus musculus 36b4</b>	5'-GTCAGTGTGCCAGCTCAGAA-3'	5'-TCAATGCTGCCTCTGGAGAT-3'

Supplementary Table 2



	Gene Expression assays Probe set
Human CTNNB1	Hs00355045_m1
Human CYP11B2	Hs01597732_m1
Human AXIN2	Hs00610344_m1
Human LEF1	Hs01547250_m1
Human NUR77	Hs00374226_m1
Human SFRP1	Hs00610060_m1
Human SFRP2	Hs00293258_m1
Human SFRP4	Hs00180066_m1
Human PPIB	Hs00168719_m1
<i>Mus musculus Cyp11b2</i>	Mm00515624_m1
<i>Mus musculus Cyp21a1</i>	Mm00487230_g1
<i>Mus musculus Nurr1</i>	Mm00443060_m1
<i>Mus musculus Nur77</i>	Mm01300401_m1
<i>Mus musculus Lef-1</i>	Mm0050265_m1
<i>Mus musculus Ppib</i>	Mm00478295_m1

Supplementary Table 3





	Forward	Reverse
hsNURR1 (Lef)	5'-GCTCGTGACGTCAGGTCGGA-3'	5'-GGACTGGCCCTGGCCGCCAAT-3'
hsNURR1 (neg)	5'-GTCACATGGGCAGAGATAGCCG-3'	5'-CCAAGCATGGCCAAACATTTC-3'
hsNUR77 (AP1)	5'-CGGGCGCGAGGAGCCTATTATAG-3'	5'-TTTCGTAGCCTCCGCCACTGG-3'
hsNUR77 (neg)	5'-CACGTGTGCACATGCGCACTCTC-3'	5'-CAGCACGGCGCTATGTGTAAAAACG-3'
hsCYP11B2 (NBRE)	5'-ATCATCACCATGCTTTGGCC-3'	5'-GCCACGAAAAGAAATGGAGG-3'
hsCYP11B2 (Ad5R-Ad1F)	5'-CAGGACTTGACGCAATGGGG-3'	5'-CTCCCTCCACCCTGTTAGCCC-3'
hsCYP11B2 (neg)	5'-CGGTGCTGCCGTTTGAAGCC-3'	5'-GGCCCCAGCTCCTGGAAGGT-3'
hsCYP21 (Lef-NBRE)	5'-CCAGAAAGCTGACTCTGGATGCAGG-3'	5'-CTCCCTTGACCCACCTTCAGG-3'
hsCYP21 (neg)	5'-CAAGCTGGTGTCTAGGAACCTACC-3'	5'-CAGAACTCCTGGGTGAGCTGCTC-3'
hsAT1R (Lef)	5'-GTTATCAGGGTGATACTGGCCTC-3'	5'-CAAGGGTGGACACTCATTTGTTCC-3'
hsAT1R (neg)	5'-CAGGCTTGGCCAGTTTGCCAGC-3'	5'-GTCAGGCCAGCCCTATCGG-3'
mmNurr1 (Lef)	5'-TCAGCCCCAGTCGTGACGTCAG-3'	5'-GGACTGGCCCTGCCCGCCAAT-3'
mmNURR1 (neg)	5'-CGATGCACAGTGGAGCCCGC-3'	5'-CCCAAGCTACCCGGGCGAG-3'
mmNur77 (AP1)	5'-CGGGCGAGAGGAAAACCTATTATAG-3'	5'-TTTCGCAGCCTCCTGCACTG-3'
mmNUR77 (neg)	5'-CCCTGCCCTGAACATGTGTGCG-3'	5'-CAGGACTGAGCTGGAGGGATAAG-3'
mmCyp11b2 (Sf1 prox)	5'-GACGTGATTAGTCGAACAGTGCAG-3'	5'-GGCCAGTGTGCGGTGGTGC-3'
mmCyp11b2 (Sf1 distal)	5'-CGTTCTAGTCCTTAGATTTATTTTAC-3'	5'-GCACAGCCTGCTAGTGGTTAG-3'
mmCyp11b2 (neg)	5'-GGTAATGACCCTTTTTGAGCTGGCTC-3'	5'-CTGACATGGCCTTCTGAGGATTTGC-3'
mmCyp21 (distal)	5'-CACAACACCCTCTGCCATGCC-3'	5'-GAGCCTCACTAAGTTGCCCAGG-3'
mmCyp21 (prox)	5'-GATGGTCCCATCTTTGATCCACAG-3'	5'-ATGGCCAGCACTTGTGCAGG-3'
mmCyp21 (neg)	5'-CACTCTGCTGCCTCCACCAG-3'	5'-GCACCTGGAAGGAGGAATCGGG-3'
mmAt1ar (Lef)	5'-CTGGCCTCGTGATACACTGC-3'	5'-GCAGCTTGAGCCACGTG-3'
mmAt1ar (neg)	5'-GGAGTCATCAAGTTTCAGGAGCCC-3'	5'-CACGGTTGGTACAAGCAGTGCAAC-3'
mmAt1br (AP1)	5'-GCCATCTACGATCCACAGC-3'	5'-CCTTCACCAGCTAGCTCTCC-3'
mmAt1br (neg)	5'-GTGGACAGAACAGCTTACCTGTAGC-3'	5'-CTGCTTAGCAAAGACTACATTTCTTAG-3'

Supplementary Table 4



Article 5 :

*mTOR pathway is activated by PKA in adrenocortical cells and participates in vivo to apoptosis resistance in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD).*

De Joussineau C, Sahut-Barnola I, Tissier F, Dumontet T, Drelon C, Batisse-Lignier M, Tauveron I, Pointud JC, Lefrançois-Martinez AM, Stratakis CA, Bertherat J, Val P, Martinez A.

Hum Mol Genet. 2014.



# mTOR pathway is activated by PKA in adrenocortical cells and participates *in vivo* to apoptosis resistance in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD)

Cyrille de Joussineau<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Sahut-Barnola<sup>1,2,3</sup>, Frédérique Tissier<sup>4,5,6,7</sup>,  
Typhanie Dumontet<sup>1,2,3</sup>, Coralie Drelon<sup>1,2,3</sup>, Marie Batisse-Lignier<sup>1,2,3,8</sup>, Igor Tauveron<sup>1,2,3,8</sup>,  
Jean-Christophe Pointud<sup>1,2,3</sup>, Anne-Marie Lefrançois-Martinez<sup>1,2,3</sup>, Constantine A. Stratakis<sup>9</sup>,  
Jérôme Bertherat<sup>4,5,6</sup>, Pierre Val<sup>1,2,3</sup> and Antoine Martinez<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Génétique Reproduction et Développement (GReD), Clermont Université, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand Cedex 1 63012, France, <sup>2</sup>CNRS, UMR 6293, GReD, INSERM, U1103, Aubière Cedex 63171, France, <sup>3</sup>GReD, INSERM, U1103, Aubière Cedex 63171, France, <sup>4</sup>Institut Cochin, Université Paris Descartes, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris 75014, France, <sup>5</sup>Department of Endocrinology and <sup>6</sup>Department of Pathology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Paris 75014, France, <sup>7</sup>Department of Pathology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, 75013 Paris, France, <sup>8</sup>Service d'Endocrinologie, Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand 63003, France and <sup>9</sup>Section on Endocrinology and Genetics, PDEGEN, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

Received April 6, 2014; Revised May 22, 2014; Accepted May 22, 2014

Primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) is associated with inactivating mutations of the *PRKAR1A* tumor suppressor gene that encodes the regulatory subunit R1 $\alpha$  of the cAMP-dependent protein kinase (PKA). In human and mouse adrenocortical cells, these mutations lead to increased PKA activity, which results in increased resistance to apoptosis that contributes to the tumorigenic process. We used *in vitro* and *in vivo* models to investigate the possibility of a crosstalk between PKA and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways in adrenocortical cells and its possible involvement in apoptosis resistance. Impact of PKA signaling on activation of the mTOR pathway and apoptosis was measured in a mouse model of PPNAD (AdKO mice), in human and mouse adrenocortical cell lines in response to pharmacological inhibitors and in PPNAD tissues by immunohistochemistry. AdKO mice showed increased mTOR complex 1 (mTORC1) pathway activity. Inhibition of mTORC1 by rapamycin restored sensitivity of adrenocortical cells to apoptosis in AdKO but not in wild-type mice. In both cell lines and mouse adrenals, rapid phosphorylation of mTORC1 targets including BAD proapoptotic protein was observed in response to PKA activation. Accordingly, BAD hyperphosphorylation, which inhibits its proapoptotic activity, was increased in both AdKO mouse adrenals and human PPNAD tissues. In conclusion, mTORC1 pathway is activated by PKA signaling in human and mouse adrenocortical cells, leading to increased cell survival, which is correlated with BAD hyperphosphorylation. These alterations could be causative of tumor formation.

\*To whom correspondence should be addressed at: GReD, CNRS UMR6293, INSERM U1103, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. Tel: +33 473407409; Fax: +33 473407042; Email: antoine.martinez@univ-bpclermont.fr



## INTRODUCTION

Primary pigmented nodular adrenal disease (PPNAD) is a benign tumor leading to pituitary-independent hypercortisolism and Cushing's syndrome (1). It is mostly detected as part of Carney complex (CNC), a rare familial disease, in which development of multiple endocrine tumors induces endocrine overactivity and significant morbidity (2). Either isolated or as part of CNC, this bilateral micronodular adrenocortical hyperplasia is genetically associated with deregulations in cAMP/PKA pathway. Indeed, inactivating mutations in the *PRKARIA* gene that encodes the type 1 $\alpha$  regulatory subunit of the PKA (R1 $\alpha$ ) (3,4) and/or mutations in the *PDE-11A* and *-8B* genes that encode phosphodiesterases (5,6) are found in most cases of PPNAD. In the adrenal, these mutations induce constitutive activation of the cAMP/PKA pathway, resulting in hypercortisolism and adrenal tumor formation in human as well as in mice bearing *Prkar1a* down-regulation (4,7). Although glucocorticoid synthesis mostly depends on a direct control by the cAMP/PKA pathway (8), PKA-dependent mechanisms involved in the deregulation of cell proliferation and/or survival leading to PPNAD remain poorly identified. A better knowledge of these events could provide new targets to inhibit the tumorigenic process and/or the endocrine overactivity.

We have previously observed that both human H295R cells in culture (9) and mouse adrenocortical cells *in vivo* (AdKO mice) (7), showed increased resistance to apoptosis in response to R1 $\alpha$  deficiency. In AdKO mice (for Adrenal cortex-specific *Prkar1a* knockout mice), this resistance coincided with the resurgence and/or incomplete clearance of the fetal X-zone that normally regresses by apoptosis. These cells with fetal characteristics that progressively invaded the entire adult cortex were proposed to be the cause of the tumorigenic process induced by R1 $\alpha$  loss. We thus concluded that resistance to apoptosis was a major mechanism for the development of adrenal tumors in response to constitutive PKA activation.

Resistance to apoptosis in adrenocortical cells has already been associated with repression of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) pathway, which *in vivo* is implicated in the clearance of the X-zone in mouse and of the fetal zone in human (10,11). Indeed, down-regulation of *PRKARIA* in H295R cells induces repression of *SMAD3* that encodes a key element of the TGF $\beta$  pathway, leading to repression of this pathway and to increased cellular resistance to apoptosis (9). Moreover, inhibin- $\alpha$ , a negative regulator of the TGF $\beta$  pathway is overexpressed specifically in the nodular tumors of PPNAD tissues and in the adrenals of the AdKO mouse model (7). In adrenal tissues, this correlates with TGF $\beta$  pathway inhibition and subsequent tumorigenesis.

However, other pathways could also be involved in resistance to apoptosis. Recently, PKA was shown to directly activate the mTOR pathway in thyroid and ovarian cell cultures *in vitro* (12,13). In human PPNAD tissues, depletion of R1 $\alpha$  protein coincides with higher mTOR activation. Furthermore, tumoral nodules are formed of hypertrophic cells that accumulate lipofuscin, indicating a decrease in autophagy typical of mTOR activation (14). Consistent with an increase in mTOR activity the fetal-like tumor cells in AdKO mice are also hypertrophic (7).

Considering the role of mTOR pathway in both cell growth and survival (15), we hypothesized that mTOR activation by

PKA could play a major role in PKA-dependent micronodular adrenocortical hyperplasia. Therefore, we have investigated the impact of increased PKA signaling on mTOR pathway activity in both adrenocortical cell lines and AdKO mice. We have also tested whether mTORC1 pathway inhibition could restore sensitivity to apoptosis in the AdKO PPNAD mouse model. Finally, we have correlated the crosstalk between PKA and mTOR to hyperphosphorylation of the BAD protein in adrenocortical cells, in mice and in patients. Our results suggest that regulation of the proapoptotic activity of BAD plays a key role in the pathogenic mechanisms resulting in PPNAD tumor formation.

## RESULTS

### Analysis of mTOR pathway activity in AdKO mice

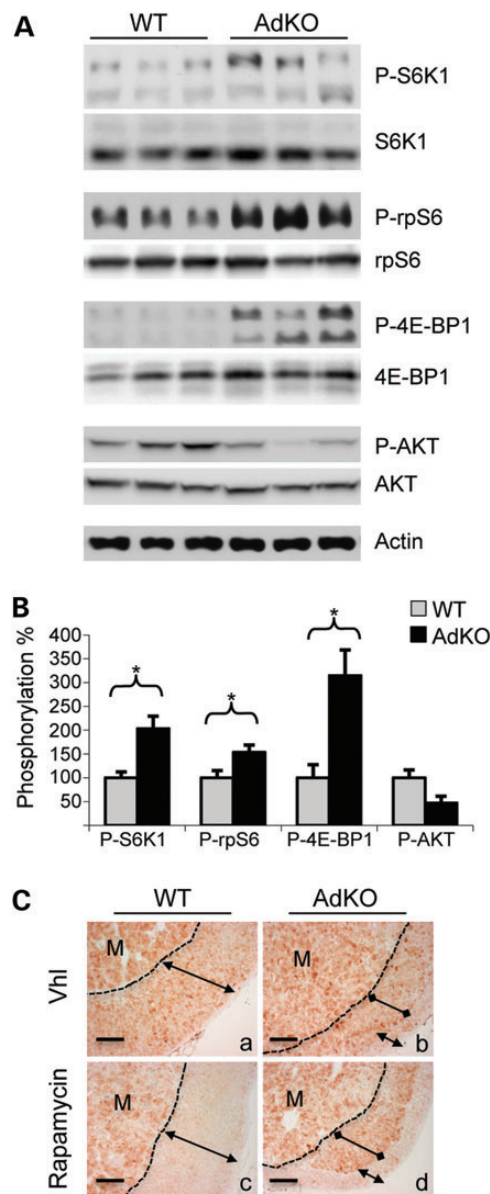
We previously showed that 12–14 month-old AdKO mice exhibited increased PKA activity and adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-independent Cushing's syndrome (7). At that age, we assessed the activity of three downstream targets of mTOR. Western blot analyses showed that p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (p70S6K1) (2-fold), ribosomal protein S6 (rpS6) (1.5-fold) and eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) (3.1-fold) were all hyperphosphorylated in AdKO adrenal extracts when compared with wild-type (WT) ( $P < 0.05$ , Fig. 1A and B). In contrast, AKT phosphorylation was not significantly affected in AdKO adrenals. This suggested that activity of the upstream members of the phosphoinositide 3-kinase/AKT/mTOR (PI3-K/AKT/mTOR) pathway was not altered in response to *Prkar1a* ablation. We then examined the effect of specific inhibition of mTORC1 by rapamycin treatment on the phosphorylation of rpS6 *in situ* (P-rpS6). In the control conditions (vehicle), WT and AdKO adrenal sections showed P-rpS6 staining throughout medulla and cortex (Fig. 1Ca). In AdKO mice, a slightly stronger staining was specifically detected in the hypertrophic cells of the tumor lesion when compared with the adjacent normal cortex (Fig. 1Cb). Rapamycin treatment resulted in a complete abolition of P-rpS6 cortical staining in WT mice (Fig. 1Cc). In contrast, P-rpS6 staining was preserved within tumoral cells of the inner cortex in AdKO mice (Fig. 1Cd). Altogether these experiments showed that mTORC1 signaling was activated downstream of PI3-K in AdKO adrenal tumors, which resulted in rapamycin-resistant rpS6 phosphorylation.

### Effect of rapamycin treatment on apoptosis in WT and AdKO mice

We then treated WT and AdKO mice with dexamethasone to induce apoptosis specifically in adrenocortical cells (16). Apoptotic figures were quantified in WT and AdKO adrenal sections after TUNEL (Fig. 2A and B) and cleaved-caspase 3 stainings (data not shown and Fig. 2C). As previously described (7), the number of apoptotic cells was significantly higher in WT than in AdKO cortex, for both TUNEL ( $109.8 \pm 9.2$  versus  $20.2 \pm 2.3$ ,  $P = 0.002$ ) and cleaved-caspase 3 stainings ( $135.4 \pm 19.6$  versus  $32.1 \pm 4.9$ ,  $P = 0.004$ ). Rapamycin treatment alone had no significant effect on basal apoptosis in both genotypes (Fig. 2C), or on dexamethasone-induced apoptosis in WT mice

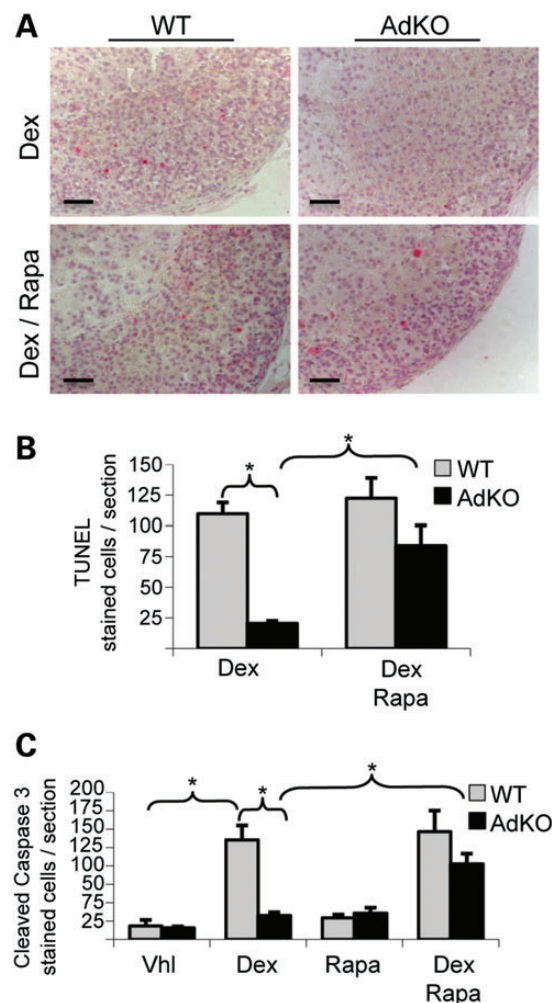






**Figure 1.** Phosphorylation of AKT/mTOR pathway proteins in adrenals of WT and AdKO mice. (A) Phosphorylated S6K1, rpS6, 4E-BP1 and AKT were detected in adrenal tissues from 12 to 14 month-old WT and AdKO mice. (B) Phosphorylation signal illustrated in A was quantified in five to six samples (values  $\pm$  SEM). Values represent relative band density of the phosphorylated forms over total signal of the corresponding proteins, expressed as a percentage of the mean of WT. \* $P < 0.05$ . (C) Immunostaining for P-rpS6 in adrenal sections of vehicle-treated (Vhl) WT (a) and AdKO (b) compared with rapamycin-treated WT (c) and AdKO (d) mice. Dotted line delineates medullary (M) and cortical compartments, normal cortex (double headed arrow) and tumoral inner cortex (double dotted arrow) are indicated. Scale bars, 100  $\mu$ m.

(Fig. 2B,  $109.8 \pm 9.2$  versus  $122.4 \pm 16.6$ ,  $P = 0.56$  and Fig. 2C). In contrast, the number of apoptotic cells per adrenal section was significantly increased in AdKO mice receiving rapamycin and dexamethasone simultaneously (Fig. 2B,  $20.2 \pm 2.3$  versus  $83.8 \pm 16.6$ ,  $P = 0.026$  and Fig. 2C). Moreover, under these conditions, differences in cell apoptosis sensitivity between WT and AdKO genotypes were abolished (Fig. 2B,  $122.4 \pm 16.6$  versus  $83.8 \pm 16.6$ ,  $P = 0.17$  and



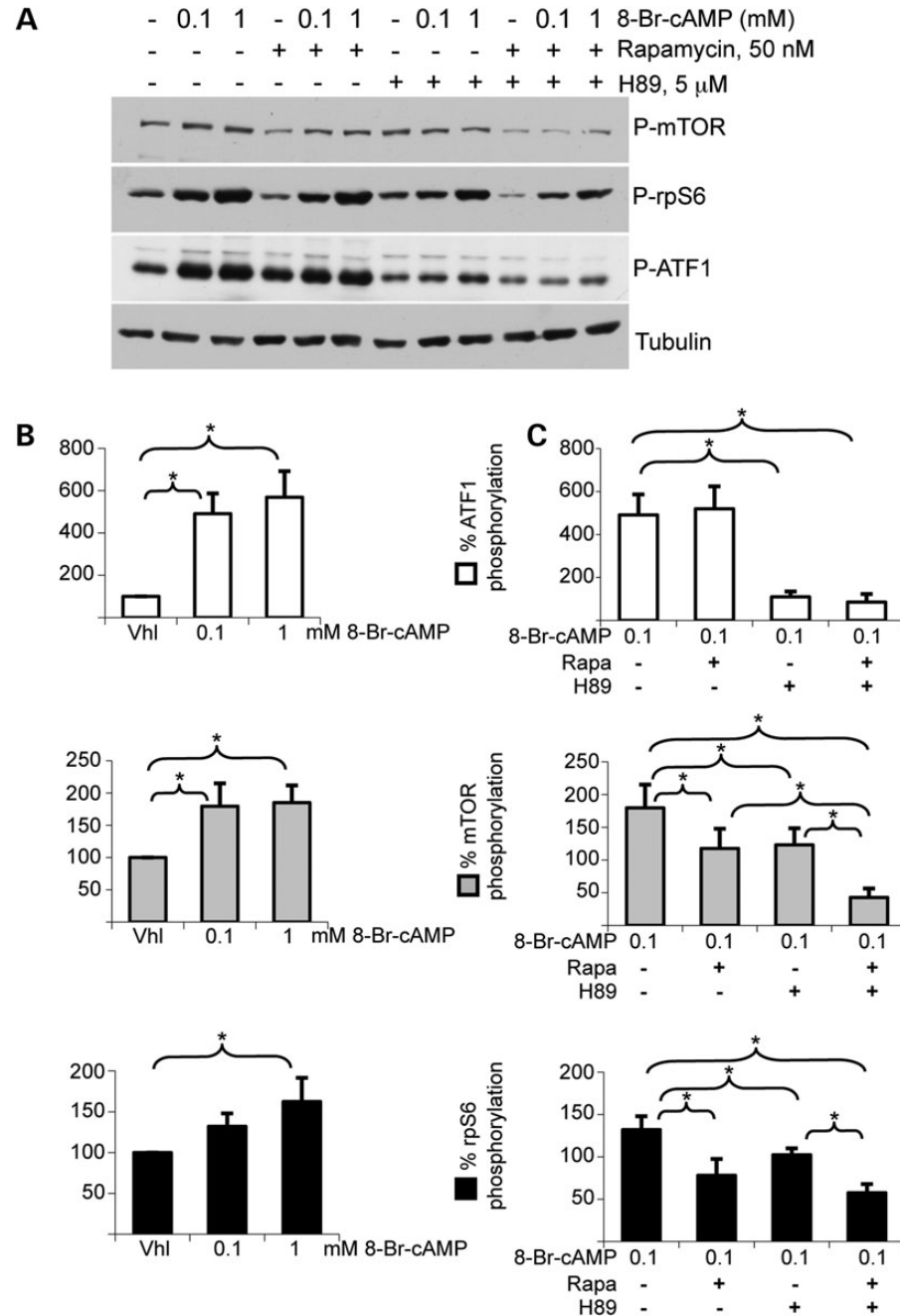
**Figure 2.** Dexamethasone-induced apoptosis in adrenals of vehicle or rapamycin-treated WT and AdKO mice. (A) TUNEL staining of adrenal sections from dexamethasone/vehicle-treated WT and AdKO (Dex) compared with dexamethasone/rapamycin-treated WT and AdKO mice (Dex/Rapa). (B) The number of TUNEL-stained cells illustrated in A was quantified in four to seven individuals per condition (values  $\pm$  SEM). Values represent the number of stained cells per adrenal section expressed as a percentage of the mean of WT. \* $P < 0.05$ . (C) Cleaved-caspase 3 staining in adrenal sections was also performed in four different treatment groups (vehicle, dexamethasone, rapamycin, dexamethasone/rapamycin) in both genotypes (WT and AdKO); the number of stained cells was quantified in four to eight individuals per condition (values  $\pm$  SEM). Values represent the number of cleaved-caspase 3 stained cells per adrenal section expressed as a percentage of the mean of WT. \* $P < 0.05$ . Vhl, vehicle; Dex, dexamethasone; Rapa, Rapamycin. Scale bars, 100  $\mu$ m.

Fig. 2C). We concluded that rapamycin treatment specifically sensitized AdKO adrenocortical cells to dexamethasone-induced apoptosis.

### PKA stimulation and mTOR activation in a human adrenocortical cell line

We then activated PKA pathway in human adrenocortical cell line H295R with growing concentrations of cAMP analog 8-Br-cAMP, for 15' (Fig. 3). ATF1, mTOR and rpS6 phosphorylation levels were all significantly increased by treatment with 1 mM 8-Br-cAMP (Fig. 3B,  $P < 0.05$ ). A lower, yet not





**Figure 3.** Phosphorylation of protein targets of PKA and AKT/mTOR signaling pathways in H295R human adrenocortical cells. (A) Phosphorylated mTOR, rpS6 and ATF1 were detected in cells treated for 15' with various combinations of PKA activator 8-Br-cAMP, PKA inhibitor H89 and mTORC1 inhibitor rapamycin. (B) Phosphorylation signals of mTOR, rpS6 and ATF1 were quantified (values  $\pm$  SEM). (C) Phosphorylation signals of mTOR, rpS6 and ATF1 in the presence of 0.1 mM of PKA activator 8-Br-cAMP were quantified after treatment by either PKA inhibitor H89 (5  $\mu$ M) and/or mTORC1 inhibitor rapamycin (50 nM). (values  $\pm$  SEM). Values in B and C represent relative band density over tubulin expressed as a percentage of the mean of the vehicle condition. Total mTOR, rpS6 and ATF1 protein signals were unaffected by these short-time treatments (not shown).  $n = 4$ ; \* $P < 0.05$ . Vhl, vehicle; Rapa, rapamycin.

significant response was observed for rpS6 phosphorylation ( $P = 0.055$ ) upon 0.1 mM 8-Br-cAMP treatment. Co-treatments with specific PKA inhibitor H89 and/or specific mTORC1 inhibitor rapamycin were performed (Fig. 3A and C). As expected, 8-Br-cAMP-induced ATF1 phosphorylation was strongly inhibited by H89 treatment ( $491.2 \pm 95.5$  versus  $109.5 \pm 25.1$ ,  $P = 0.0058$ ), but was unaltered in response to rapamycin ( $491.2 \pm$

$95.5$  versus  $519.9 \pm 104.4$ ,  $P = 0.68$ ). Simultaneous treatment with H89 and rapamycin induced very similar response to treatment with H89 alone ( $491.2 \pm 95.5$  versus  $85.8 \pm 37$ ,  $P = 0.005$ ). mTOR and rpS6 phosphorylation levels were significantly inhibited by rapamycin or H89 treatment ( $P < 0.05$ ) and a maximal inhibition occurred when rapamycin and H89 were simultaneously applied (mTOR:  $179.6 \pm 35.5$  versus  $42.8 \pm 13.8$ ,



$P = 0.0054$ ; rpS6:  $132.1 \pm 15.9$  versus  $57.5 \pm 10.3$ ,  $P = 0.0044$ ). We concluded that PKA stimulation induced activation of mTOR pathway in human adrenocortical cells.

#### PKA stimulation and mTOR activation in a mouse adrenocortical cell line

Similar experiments were then performed in the adrenocortical mouse cell line ATC7 (17) (Fig. 4). CREB, mTOR, S6K1 and rpS6 were all phosphorylated in a dose-dependent manner in response to ACTH, the natural hormonal inducer of PKA signaling in the adrenal cortex (Fig. 4A). The specific PKA activator 8-Br-cAMP had a comparable effect, indicating that the phosphorylation of all these proteins in response to ACTH was mediated by PKA activation (Fig. 4B). Kinetics experiments (2' to 1 h, Fig. 4B) showed that phosphorylation of CREB, mTOR and rpS6 occurred as early as 2' after ACTH treatment, with a maximum was achieved after 15'. Interestingly, AKT phosphorylation was not enhanced by ACTH and even tended to decrease over time (Fig. 4B). However, as expected, activation of PI3K/AKT/mTOR pathway by insulin induced a strong phosphorylation of AKT, showing that it was able to respond to specific activation in these cells (Fig. 4B). Finally, mechanisms of ACTH activation were tested in the presence of PKA inhibitor H89 and/or mTORC1 inhibitor rapamycin (Fig. 4C). ACTH-dependent PKA activation induced a significant increase in CREB, mTOR and rpS6 phosphorylation ( $P < 0.01$ ). As in the H295R cell line, ACTH-dependent CREB phosphorylation was significantly inhibited by H89 treatment ( $417.6 \pm 91.5$  versus  $284.8 \pm 50.3$ ,  $P = 0.0073$ ) but was unaltered by rapamycin treatment ( $417.6 \pm 91.5$  versus  $440.3 \pm 118.1$ ,  $P = 0.86$ ). The combined treatment with H89 and rapamycin had a similar effect to H89 alone ( $417.6 \pm 91.5$  versus  $246.3 \pm 83.9$ ,  $P = 0.03$ ). mTOR phosphorylation was insensitive to treatments with rapamycin and/or H89. However, as in H295R cells, rpS6 phosphorylation was significantly inhibited by rapamycin or H89 treatment ( $P < 0.05$ ) and a maximal inhibition was observed in response to simultaneous exposure to rapamycin and H89 ( $199.5 \pm 24.7$  versus  $74.6 \pm 14.9$ ,  $P = 0.0085$ ). We concluded that PKA stimulation induced activation of mTOR pathway in murine adrenocortical cells.

#### PKA stimulation and resistance to apoptosis in a mouse adrenocortical cell line

ATC7 cells were treated with HA14-1, a molecule designed to trap anti-apoptotic BCL-2/BCL-XL proteins and to induce apoptosis as a result (Fig. 5) (18). Immunodetection of the cleaved forms of PARP and Caspase-3 showed an induction of apoptosis upon HA14-1 treatment (Fig. 5A). Interestingly, forskolin co-treatment, which induced PKA activation as shown by AKR1B7 induction, had a significant inhibitory effect on the cleavage of apoptotic markers PARP ( $100 \pm 10.2$  versus  $42.8 \pm 4.1$ ,  $P = 0.005$ ) and Caspase-3 ( $100 \pm 3.3$  versus  $26.6 \pm 10.6$ ,  $P = 0.02$ ) (Fig. 5A and B). This inhibitory effect of PKA activation on HA14-1-induced apoptosis was further confirmed by the decreased percentage of sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cells in flow cytometric analyses (vehicle-treated,  $47.0 \pm 3.5\%$  versus Fsk-treated,  $26.2 \pm 4.1\%$ ,  $P = 0.017$  and not shown). We then evaluated the phosphorylation, i.e. inactivation, of the

proapoptotic protein BAD in ACTH-treated ATC7 cells. Two residues were studied, serine 112, which is known to be phosphorylated by PKA, and serine 136, whose phosphorylation depends on AKT and p70S6K1. Both residues were phosphorylated in a dose-dependent manner after 15' of ACTH treatment (Fig. 5C). A similar result was also observed in response to the specific PKA activator 8-Br-cAMP (Fig. 5D). Interestingly, during induction kinetics with ACTH, BAD phosphorylation at both positions paralleled CREB phosphorylation, but seemed cumulative over the time of experiment (Fig. 5D), exceeding the phosphorylation levels induced by 15' treatment with either 8-Br-cAMP or insulin (Fig. 5D).

#### PKA stimulation and BAD phosphorylation in mouse and human PPNAD

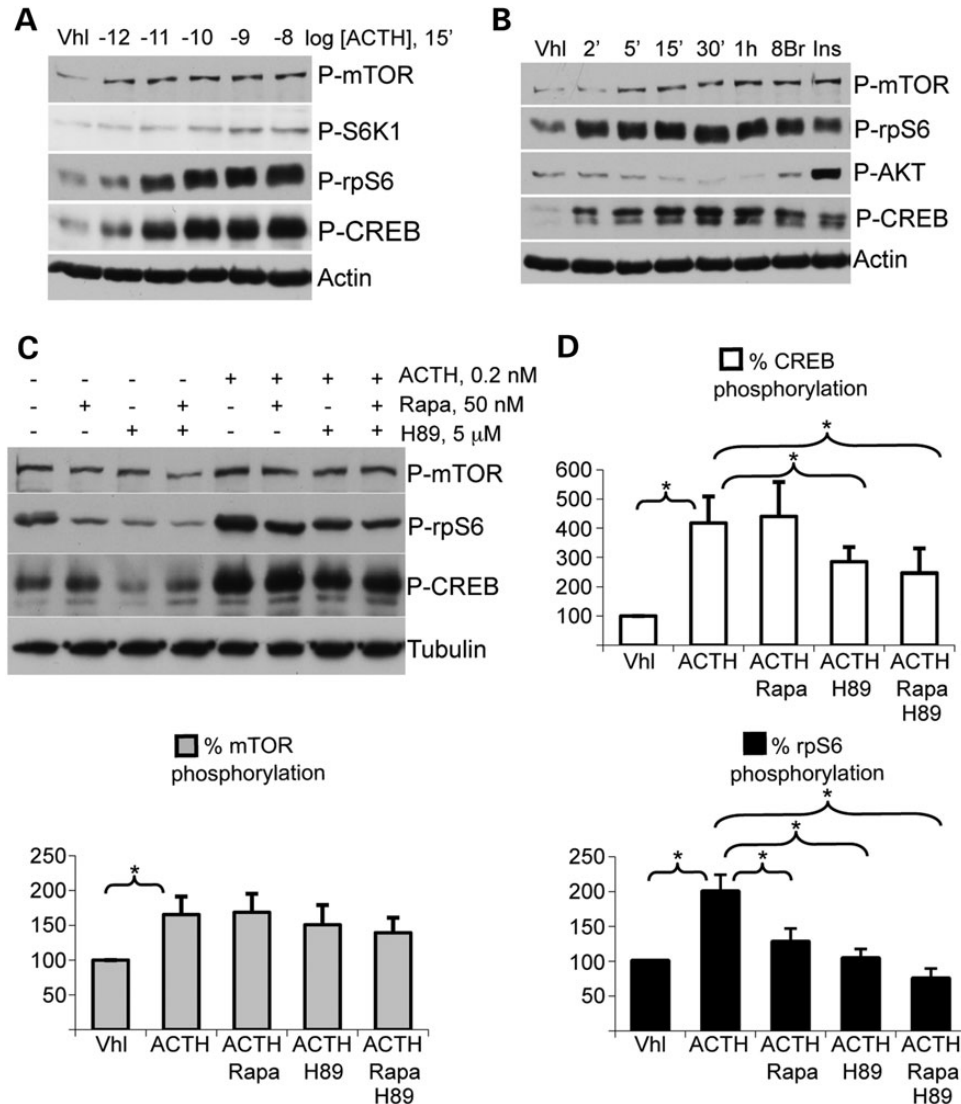
Next, we looked for the same kind of correlation *in vivo*. WT mice were injected with ACTH and culled 2 h later. Strong PKA activation resulted in an increase in plasma corticosterone levels (vehicle-treated,  $15.2 \pm 2.3$  versus ACTH-treated,  $310 \pm 24$ , in ng/ml,  $P < 0.001$ ). Immunodetection of total and phosphorylated forms of BAD and rpS6 was performed on adrenal extracts (Fig. 6A and B). As expected, rpS6 was more phosphorylated in ACTH-treated than in vehicle-treated mice (2-fold,  $P < 0.001$ ). Total (2.6-fold,  $P < 0.001$ ) and phosphorylated BAD levels were significantly increased by ACTH treatment. When normalized according to total BAD levels, BAD phosphorylation was increased at Ser112 (3.8-fold,  $P < 0.001$ ) but was unaltered at Ser136 (1.08-fold,  $P = 0.64$ ). We then evaluated phosphorylation and global expression of BAD in AdKO mice (Fig. 6C and D). Total BAD levels were not significantly affected in these mice, although they tended to increase by 26% ( $P = 0.07$ ). Interestingly, an increased phosphorylation level of BAD was found at Ser112 as well as at Ser136 (2.6-fold,  $P = 0.0028$  and 1.5-fold,  $P = 0.025$ , respectively). Levels of the anti-apoptotic BCL-XL protein were found unchanged between WT and AdKO adrenal extracts (Fig. 6C and D). Finally, immunohistological stainings were performed on human PPNAD sections. Both Ser112 and Ser136 residues of BAD were found specifically hyperphosphorylated in the cells of the tumor nodules (Fig. 6E and F). Importantly, the expected hyperphosphorylation of rpS6 was detected in the nodules while no hyperphosphorylation of AKT was revealed in the same tissues (Fig. 6G). Therefore, we concluded that a positive correlation existed between PKA activation and BAD phosphorylation both in a mouse model of *Prkar1a* inactivation and in patients with PPNAD.

## DISCUSSION

Although PKA plays a central role in the development of PPNAD, the molecular underpinnings of its tumorigenic activity remain elusive. On the basis of *in vitro* data, it had been proposed that PKA may act at least in part, through stimulation of mTOR signaling (14). Here we show that mTORC1 pathway activity is partially dependent on PKA pathway activity in adrenocortical cells in culture and *in vivo* both in a mouse model of PPNAD and in patients.







**Figure 4.** Phosphorylation of protein targets of PKA and AKT/mTOR signalling pathways in murine ATC7 adrenocortical cells. (A) Phosphorylated mTOR, S6K1, rpS6 and CREB were detected in cells treated for 15' with increasing concentrations of ACTH. (B) Phosphorylated AKT, mTOR, rpS6 and CREB were detected in cells treated for 2' to 1 h with PKA hormonal activator ACTH or for 15' with either the specific PKA activator 8-Br-cAMP or the PI3K/AKT/mTOR pathway hormonal activator insulin. (C) Phosphorylated mTOR, rpS6 and CREB were detected in cells treated in various combinations with ACTH, PKA inhibitor H89 and mTORC1 inhibitor rapamycin. (D) Corresponding phosphorylation signals of mTOR, rpS6 and CREB were quantified (values  $\pm$  SEM). Values represent relative band density over tubulin expressed as a percentage of the mean of the control. Total mTOR, S6K1, rpS6 and CREB protein signals were unaffected by these short-time treatments (not shown).  $n = 4$ ; \* $P < 0.05$ . Vhl, vehicle; 8Br, 8-Br-cAMP; Ins, insulin; Rapa, rapamycin.

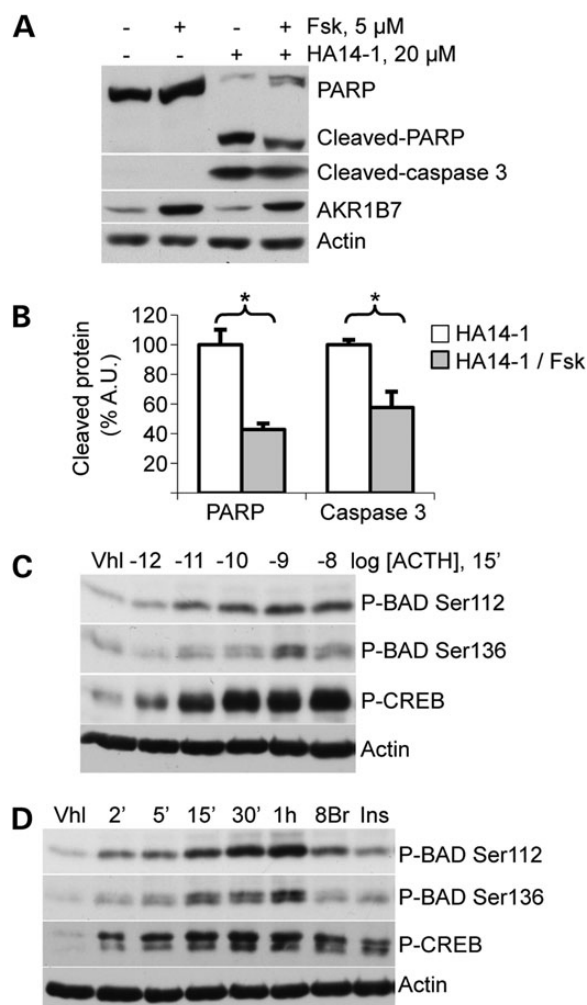
### Interaction between PKA and mTOR pathways

Interestingly, at least three different mechanisms were described for this crosstalk. In PPNAD, it has been proposed that R1 $\alpha$  was able to bind to and regulate mTOR kinase activity through a mechanism reminiscent of its regulation of the catalytic subunits of PKA (14,20). In thyroid cells, PKA phosphorylated Thr246 residue of the negative mTOR regulator PRAS40 and consequently induced its dissociation from mTOR (12). In pancreatic  $\beta$ -cells, rpS6 protein was described as a direct target of the PKA catalytic subunit (21). Our observations in both ATC7 and H295R cell lines indicate a short-term interaction between PKA activation and mTOR pathway activation (Fig. 3 and 4). In human adrenocortical H295R cells, cAMP-induced mTOR

phosphorylation was decreased by H89 (Fig. 3A and C), showing that PKA catalytic activity was required to achieve this phosphorylation. In murine ATC7 cells, mTOR phosphorylation was only mildly induced by PKA stimulation and was insensitive to H89 or rapamycin treatment (Fig. 4C and D). However, in these cells, Thr389 phosphorylation of S6K1 was increased by ACTH, serum or insulin treatment but completely abolished in the presence of rapamycin (Supplementary Material, Fig. S1). This suggested that although there was no obvious change in mTOR phosphorylation, mTOR kinase activity was obviously affected. In ATC7 cells, rpS6 was still phosphorylated in response to ACTH treatment in the presence of rapamycin (Fig. 4C, compare lanes 2 and 6:  $52.6 \pm 14.3$  versus  $127.3 \pm 19.7$ ,  $P = 0.025$ ). Considering the dramatic effect of rapamycin







**Figure 5.** Apoptosis induction and BAD phosphorylation in murine ATC7 adrenocortical cells. (A) PARP and Caspase 3 cleavage and AKR1B7 levels were detected in ATC7 cells treated with PKA pathway activator forskolin (Fsk) and/or apoptosis inducer HA14-1 for 4 h. (B) PARP and Caspase 3 cleavage was quantified in response to HA14-1 in the presence or absence of forskolin (values  $\pm$  SEM). Values represent relative band density over actin for cleaved-caspase 3 and relative cleaved protein over total protein for cleaved-PARP, expressed as a percentage of the mean of the control.  $n = 5$ ;  $*P < 0.05$ . Vhl, vehicle. (C) BAD phosphorylation at Ser112 or Ser136 positions was detected in cells treated for 15' with increasing concentrations of ACTH. (D) BAD phosphorylation at Ser112 or Ser136 positions was detected in cells treated for various amounts of time with the PKA pathway activator ACTH or for 15' with either the specific PKA activator 8-Br-cAMP (8Br) or PI3K/AKT/mTOR pathway activator insulin (Ins). Total BAD and CREB protein signals were unaffected by these short-time treatments (not shown).

on S6K1, this rapamycin-resistant rpS6 phosphorylation may be due to a direct action of PKA kinase activity on rpS6 (21). Accordingly, in our PPNAD mouse model, rapamycin treatment sensitized adrenal cortical cells to apoptosis (Fig. 2), in the absence of effect on rpS6 phosphorylation in the tumor (Fig. 1C). Taken together, these results suggested that in the adrenal cortex, PKA–mTOR crosstalk is ensured by at least two non-exclusive PKA-dependent mechanisms: the phosphorylation of mTOR and the phosphorylation of mTOR downstream targets (Supplementary Material, Fig. S2).

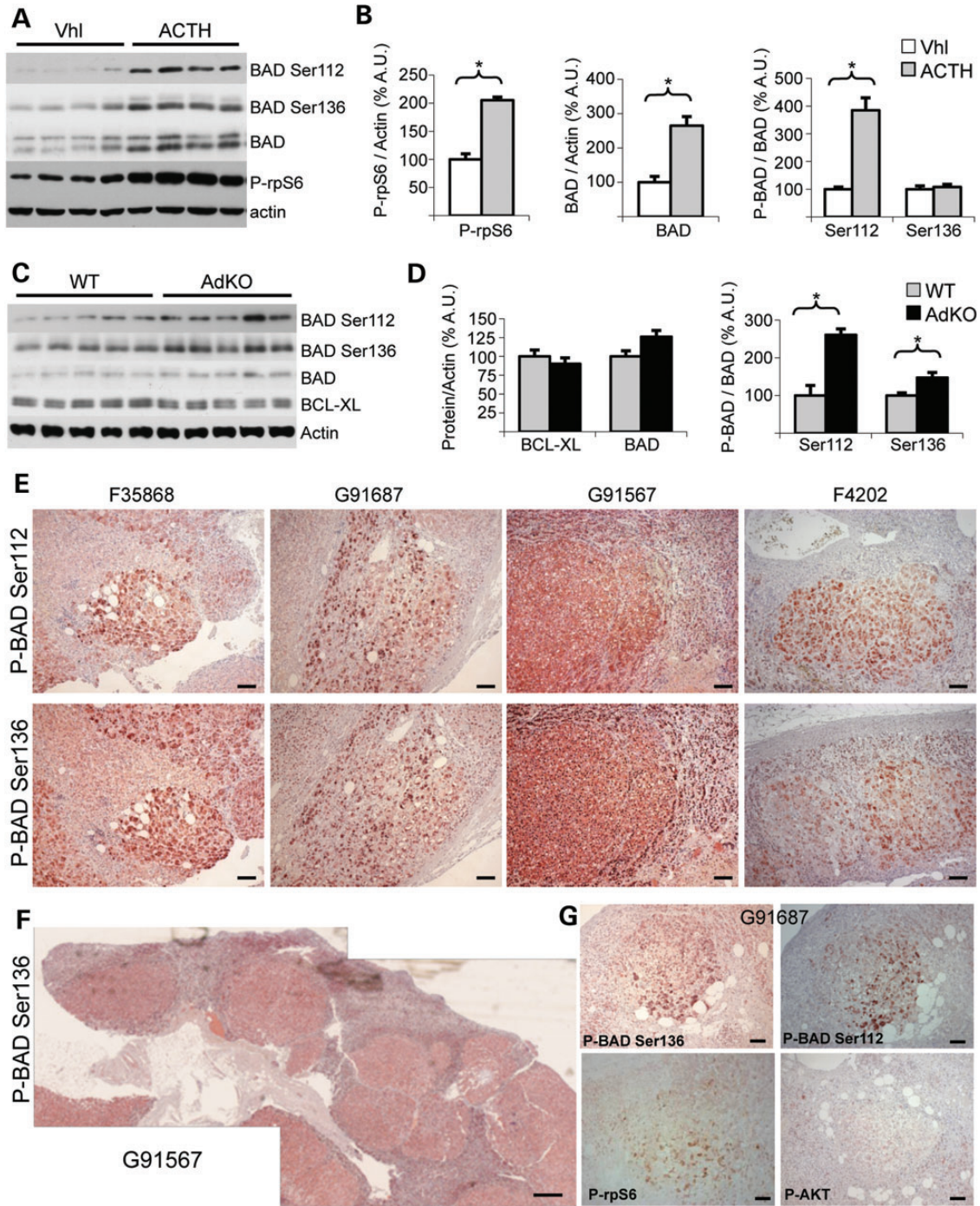
### Role of AKT/PKB in the interaction between PKA and mTOR pathways

mTOR is a downstream target of AKT/PKB (22) and AKT/PKB kinase activity has also been implicated in tumorigenesis (23) and could participate to PPNAD. We thus analysed a potential involvement of AKT/PKB in the crosstalk between PKA and mTOR signaling pathways. The phosphorylation of Ser473 reflects the activity of the AKT/PKB kinase (24). In ATC7 cells, insulin treatment induced a robust phosphorylation of AKT, mTOR, rpS6 (Fig. 4B) and S6K1 (Supplementary Material, Fig. S1). However, Ser473 phosphorylation of AKT was insensitive to ACTH treatment, and even tended to decrease over 1 h (Fig. 4B). In AdKO mice, mTOR pathway activation was observed in the absence of increased AKT Ser473 phosphorylation. These results are consistent with human data. Indeed, no hyperphosphorylation of AKT/PKB was detected in PPNAD nodules (25), a result we confirmed in the PPNAD samples that we processed in this study (Fig. 6G). Taken together, these data indicate that AKT is not involved in PKA-driven mTOR pathway activation in adrenocortical cell cultures as well as *in vivo* in AdKO mice adrenals and in human PPNAD tissues. Thus, AKT is not essential to the tumorigenic process in the context of PPNAD.

### BAD as a potential anti-apoptotic effector of PKA–mTOR crosstalk

BAD is a proapoptotic member of the BCL-2 family, which induces apoptosis by preventing BAX from binding to BCL-2 and BCL-XL (26). BAD is phosphorylated in response to many survival pathways, its phosphorylation resulting in an inactivation through cytoplasmic retention by 14-3-3 sigma (27). The phosphorylation of Ser112 and Ser155 residues is essentially dependent on PKA activity (28,29), while Ser136 phosphorylation can be achieved by AKT or S6K1 (30,31). Our data showed that BAD phosphorylation was achieved through PKA stimulation in both adrenocortical cell cultures and *in vivo*. Moreover, when observed in WT mice, PKA stimulation induced a classical phosphorylation on BAD Ser112, but no response from BAD Ser136 (Fig. 6A and B). In contrast, in AdKO mice, basal phosphorylation at both Ser112 and Ser136 was increased when compared with WT mice (Fig. 6C and D). Consistent with these data, both Ser112 and Ser136 were highly phosphorylated in PPNAD nodules (Fig. 6E). Our data show that AKT activity is not increased in AdKO mice and PPNAD nodules, which suggests that BAD Ser136 phosphorylation results from increased S6K1 activity in response to PKA activation. Altogether, these observations support the hypothesis that activation of mTOR pathway could be involved in PKA-dependent resistance to apoptosis, which could sensitize adrenocortical cells to tumor development. However, at present, it remains uncertain whether BAD hyperphosphorylation is the principal effector of the anti-apoptotic effects of increased PKA signaling. Alterations in other pathways cannot be ruled out in PPNAD and might cooperate with mTOR activation. For instance, we previously showed that increased cell survival in both PPNAD and animal models appeared to be correlated to inhibition of TGF $\beta$ /activin signaling (7,9). To what extent these different signaling pathways are responsible for apoptosis resistance and tumor development remains to be explored.





**Figure 6.** Ser112 and Ser136 phosphorylation of BAD in adrenals from WT and AdKO mice. (A) P-rpS6, BAD, P-BAD Ser112 and P-BAD Ser136 were detected in adrenal tissues from ACTH-treated or from vehicle-treated WT mice (Vhl). (B) Results illustrated in A were quantified (values  $\pm$  SEM). Values represent relative band density over actin expressed as a percentage of the mean of vehicle-treated mice for P-rpS6 and BAD, and relative band density over BAD expressed as a percentage of the mean of vehicle-treated mice for the two forms of P-BAD.  $n = 7$ . (C) BCL-XL, BAD, P-BAD Ser112 and P-BAD Ser136 were detected in adrenal tissues from 12 to 14 month-old WT and AdKO mice. (D) Results illustrated in C were quantified on five WT and six AdKO mice (values  $\pm$  SEM). Values represent relative band density over actin expressed as a percentage of the mean of WT mice for BCL-XL and BAD, and relative band density over BAD expressed as a percentage of the mean of WT mice for the two forms of P-BAD. (E–G) P-BAD Ser112, P-BAD Ser136, P-rpS6 and P-AKT were detected in PPNAD human adrenal samples from patients carrying germline *PRKARIA*-inactivating mutation (19) and counterstained with hematoxylin. \* $P < 0.05$ . Scale bars, 100  $\mu$ m in magnification and 500  $\mu$ m in entire adrenal.





### mTOR as therapeutic target: the possibility of rapamycin treatment in Carney complex?

Our data show that rapamycin treatment suppresses apoptosis resistance in adrenal tumors from mice lacking R1 $\alpha$  (AdKO) but does not trigger apoptosis in WT (Fig. 2). These results indicate that (i) mTORC1 pathway is involved in the (R1 $\alpha$ )-PKA-dependent increased cell survival, (ii) mTORC1 pathway is likely to be involved in adrenal tumorigenesis and (iii) rapamycin treatment might be a potential tool to correct the deleterious effect of (R1 $\alpha$ )-PKA-dependent mTORC1 overactivity in PPNAD, as previously hypothesized (14).

In summary, we demonstrated that mTOR pathway is activated through PKA overactivity in adrenocortical cells. This phenomenon occurs *in vitro* as well as *in vivo* and in PPNAD patients (14). We revealed a correlation, *in vitro*, *in vivo* and in PPNAD samples, between PKA/mTOR activation and BAD phosphorylation, which could be a mechanism accounting for resistance to apoptosis. We hypothesized that this could be important in adrenal tumorigenesis, and found that in a mouse model of PPNAD, mTORC1 pathway down-regulation by rapamycin sensitized adrenocortical cells to apoptosis, the phenomenon thought to be responsible for hyperplasia in this model. Considering that mTOR is overactivated in many tumors of different tissues (32), mTOR pathway appears as a good candidate for early steps of adrenal tumorigenesis. Consequently, rapamycin could present a therapeutic potential in the treatment of adrenal hyperplasia. Furthermore, in the context of Carney complex, PKA pathway overactivation is known for its tumorigenic potential in other endocrine tissues and in the heart and skin (2,33,34). It would be interesting to study the relevance of PKA-mTOR crosstalk in these tissues and its potential involvement in their tumorigenesis.

## MATERIALS AND METHODS

### Human PPNAD tissue sections

Informed signed consent for the analysis of adrenal tissue and for genetic diagnosis was obtained from the patients. The study was approved by an institutional review board (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale, Cochin Hospital, Paris). PPNAD paraffin sections were cut from adrenal samples of patients who underwent bilateral adrenalectomy for ACTH-independent Cushing's syndrome in the context of isolated PPNAD or PPNAD within Carney complex. All patients carried germline inactivating mutations of the *PRKARIA* gene.

### Animals and hormonal treatments

Animal studies were conducted in agreement with international standards for animal welfare and approved by Auvergne Ethics Committee. Treatments were performed on adult male mice, with procedures depending on the considered compound: dexamethasone acetate in sesame oil was injected subcutaneously for 4 days (75  $\mu$ g/mouse twice a day, Sigma-Aldrich); vehicle (NaCl 0.9%) or ACTH (1.2 U/mouse, Synacthene Retard, Novartis Pharma S.A.) were given as a single intra-muscular injection 2 h before culling. Rapamycin (5 mg/kg bodyweight/day) or corresponding vehicle was provided as intraperitoneal

injections for 4 days. Rapamycin (#R-5000, LC Laboratories) was diluted at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml in a vehicle solution of phosphate buffered saline/10%, tween80/5%, ethanol/5%, cremophor (#C5135, Sigma-Aldrich).

### Cultured cells and treatments

Mouse adrenocortical ATC7 cells and human adrenocortical H295R cancer cells were cultured as previously described and maintained in serum-free media for 12 h before treatments (17,35). ACTH (0.25 mg/ml Synacthene Immediat, Novartis Pharma S.A) or Insulin (#I3536, Sigma-Aldrich) were diluted in DMEM/Ham's F12 medium; Rapamycin (#R-5000, LC laboratories), H89 (#EI196, Biomol Research Laboratories), 8-Br-cAMP, forskolin, HA14-1 (#B7880, #F6886, #H8787, respectively, Sigma-Aldrich) were resuspended in DMSO, which was also used as the control in all experiments. In all cases, the final concentration of DMSO was maintained <0.1%. Where required, cell cultures were pre-incubated with inhibitors (rapamycin or H89) for 1 h before adding inducers. To minimize side-effects of treatments in the short-time experiments, inducers were added to prewarmed media at a two-fold concentration. Prewarmed media were then added directly to culture media so as to be diluted two-fold. To terminate experiments, culture media were removed and cells were directly treated with cold extraction buffer on ice.

### Histology and immunostaining

Preparation of adrenal samples and stainings/counterstainings were performed as previously described (7). The following primary antibodies were used according to manufacturers' protocols: anti-cleaved-caspase 3 (Asp175) (Cell Signaling, #9661), anti-P-rpS6 ribosomal protein Ser235-236 (Cell Signaling, #2211), anti-P-BAD Ser112 (Cell Signaling, #5284); anti-P-BAD Ser136 (Abcam, #ab28824); anti-P-AKT1/PKBa Ser473 (Epitomics, #2118-1).

### Western blot analysis

Extraction of adrenal samples or cellular samples and western blotting were done as previously described (7). The following primary antibodies, if not specified, were used as described in manufacturers' protocols: anti-CREB #9192, anti-P-CREB Ser133 #9191, anti-mTOR #2972, anti-P-mTOR Ser2448 #2971, anti-S6K1 #9202, anti-P-S6K1 Thr389 #9205, anti-rpS6 #2217, anti-P-rpS6 Ser235-236 #2211 (1/5000), anti-4EBP1 #9644, anti-P-4EBP1 Thr37-46 #2855 (1/3000), anti-cleaved-caspase 3 (Asp175) #9661, anti-BAD #9292, anti-P-BAD Ser112 #5284, anti-P-BAD Ser136 #4366 (from Cell Signaling); anti-actin #A2066, anti-tubulin #T0198 (from Sigma-Aldrich); anti-P-AKT1/PKBa Ser473 (Epitomics, #2118-1); anti-AKR1B7 antibody (36). Western blot signals were quantified with a DNR MF ChemiBis 3.2 camera and Multi Gauge Software suite (Fujifilm).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Student's *t* test. *P*-values under 0.05 were considered significant.



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen and Philippe Mazuel for excellent animal care. Tissue analyses were performed at Anipath Clermont core facility.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## FUNDING

This work was supported by Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Agence National de la Recherche (grant ANR-08-GENOPAT-007).

## REFERENCES

- Shenoy, B.V., Carpenter, P.C. and Carney, J.A. (1984) Bilateral primary pigmented nodular adrenocortical disease. Rare cause of the Cushing syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.*, **8**, 335–344.
- Carney, J.A., Gordon, H., Carpenter, P.C., Shenoy, B.V. and Go, V.L. (1985) The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)*, **64**, 270–283.
- Casey, M., Vaughan, C.J., He, J., Hatcher, C.J., Winter, J.M., Weremowicz, S., Montgomery, K., Kuchelapati, R., Morton, C.C. and Basson, C.T. (2000) Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *J. Clin. Invest.*, **106**, R31–R38.
- Kirschner, L.S., Carney, J.A., Pack, S.D., Taymans, S.E., Giatzakis, C., Cho, Y.S., Cho-Chung, Y.S. and Stratakis, C.A. (2000) Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat. Genet.*, **26**, 89–92.
- Horvath, A., Boikos, S., Giatzakis, C., Robinson-White, A., Groussin, L., Griffin, K.J., Stein, E., Levine, E., Delimpasi, G., Hsiao, H.P. *et al.* (2006) A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat. Genet.*, **38**, 794–800.
- Horvath, A., Mericq, V. and Stratakis, C.A. (2008) Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.*, **358**, 750–752.
- Sahut-Barnola, I., de Jousineau, C., Val, P., Lambert-Langlais, S., Damon, C., Lefrancois-Martinez, A.M., Pointud, J.C., Marceau, G., Sapin, V., Tissier, F. *et al.* (2010) Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. *PLoS Genet.*, **6**, e1000980.
- Rae, P.A., Gutmann, N.S., Tsao, J. and Schimmer, B.P. (1979) Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1896–1900.
- Ragazzon, B., Cazabat, L., Rizk-Rabin, M., Assie, G., Groussin, L., Fierrard, H., Perlemoine, K., Martinez, A. and Bertherat, J. (2009) Inactivation of the Carney complex gene 1 (protein kinase A regulatory subunit 1A) inhibits SMAD3 expression and TGF beta-stimulated apoptosis in adrenocortical cells. *Cancer Res.*, **69**, 7278–7284.
- Beuschlein, F., Looyenga, B.D., Bleasdale, S.E., Mutch, C., Bavers, D.L., Parlow, A.F., Nilson, J.H. and Hammer, G.D. (2003) Activin induces x-zone apoptosis that inhibits luteinizing hormone-dependent adrenocortical tumor formation in inhibin-deficient mice. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 3951–3964.
- Spencer, S.J., Mesiano, S., Lee, J.Y. and Jaffe, R.B. (1999) Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 1110–1115.
- Blancquaert, S., Wang, L., Paternot, S., Coulonval, K., Dumont, J.E., Harris, T.E. and Roger, P.P. (2010) cAMP-dependent activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in thyroid cells. Implication in mitogenesis and activation of CDK4. *Mol. Endocrinol.*, **24**, 1453–1468.
- Palaniappan, M. and Menon, K.M. (2010) Human chorionic gonadotropin stimulates theca-interstitial cell proliferation and cell cycle regulatory proteins by a cAMP-dependent activation of AKT/mTORC1 signaling pathway. *Mol. Endocrinol.*, **24**, 1782–1793.
- Mavrikakis, M., Lippincott-Schwartz, J., Stratakis, C.A. and Bossis, I. (2006) Depletion of type IA regulatory subunit (RIalpha) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 2962–2971.
- Watanabe, R., Wei, L. and Huang, J. (2011) mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets. *J. Nucl. Med.*, **52**, 497–500.
- Thomas, M., Keramidas, M., Monchaux, E. and Feige, J.J. (2004) Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology*, **145**, 4320–4329.
- Ragazzon, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Val, P., Sahut-Barnola, I., Tournaire, C., Chambon, C., Gachancard-Bouya, J.L., Begue, R.J., Veyssiere, G. and Martinez, A. (2006) Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology*, **147**, 1805–1818.
- Wang, J.L., Liu, D., Zhang, Z.J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S.M., Croce, C.M., Alnemri, E.S. and Huang, Z. (2000) Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7124–7129.
- Groussin, L., Horvath, A., Jullian, E., Boikos, S., Rene-Corail, F., Lefebvre, H., Cephe-Velayoudom, F.L., Vantyghem, M.C., Chanson, P., Conte-Devolx, B. *et al.* (2006) A PRKAR1A mutation associated with primary pigmented nodular adrenocortical disease in 12 kindreds. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 1943–1949.
- Mavrikakis, M., Lippincott-Schwartz, J., Stratakis, C.A. and Bossis, I. (2007) mTOR kinase and the regulatory subunit of protein kinase A (PRKAR1A) spatially and functionally interact during autophagosome maturation. *Autophagy*, **3**, 151–153.
- Moore, C.E., Xie, J., Gomez, E. and Herbert, T.P. (2009) Identification of cAMP-dependent kinase as a third in vivo ribosomal protein S6 kinase in pancreatic beta-cells. *J. Mol. Biol.*, **389**, 480–494.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. and Guan, K.L. (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 648–657.
- Chen, M.L., Xu, P.Z., Peng, X.D., Chen, W.S., Guzman, G., Yang, X., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P. and Hay, N. (2006) The deficiency of Akt1 is sufficient to suppress tumor development in Pten +/- mice. *Genes. Dev.*, **20**, 1569–1574.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **307**, 1098–1101.
- Robinson-White, A., Meoli, E., Stergiopoulos, S., Horvath, A., Boikos, S., Bossis, I. and Stratakis, C.A. (2006) PRKAR1A mutations and protein kinase A interactions with other signaling pathways in the adrenal cortex. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 2380–2388.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, **80**, 285–291.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, **87**, 619–628.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J., Taylor, S.S., Scott, J.D. and Korsmeyer, S.J. (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol. Cell.*, **3**, 413–422.
- Lizcano, J.M., Morrice, N. and Cohen, P. (2000) Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem. J.*, **349**, 547–557.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231–241.
- Harada, H., Andersen, J.S., Mann, M., Terada, N. and Korsmeyer, S.J. (2001) p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9666–9670.
- Morgensztern, D. and McLeod, H.L. (2005) PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs*, **16**, 797–803.
- Carney, J.A., Headington, J.T. and Su, W.P. (1986) Cutaneous myxomas. A major component of the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Arch. Dermatol.*, **122**, 790–798.





34. Pringle, D.R., Vasko, V.V., Yu, L., Manchanda, P.K., Lee, A.A., Zhang, X., Kirschner, J.M., Parlow, A.F., Saji, M., Jarjoura, D. *et al.* (2014) Follicular thyroid cancers demonstrate dual activation of PKA and mTOR as modeled by thyroid specific deletion of *Prkar1a* and *Pten* in mice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **99**, E804–E812.
35. Groussin, L., Massias, J.F., Bertagna, X. and Bertherat, J. (2000) Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and compensatory overexpression of the activator CREMtau in the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 345–354.
36. Lefrançois-Martinez, A.M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Gallo-Payet, N., Hyndman, D., Veyssiere, G., Bertagna, X., Jean, C. and Martinez, A. (2004) Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 3010–3019.

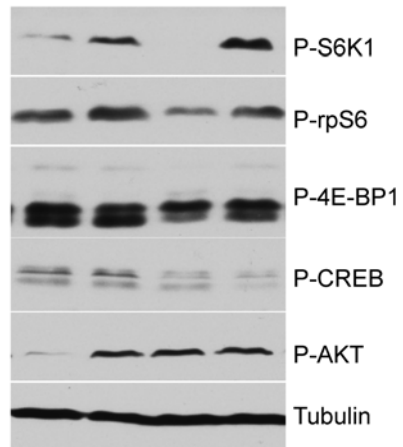


**Supplemental Figure 1.** Effect of rapamycin and H89 on insulin-mediated activation of PI3K/AKT/mTOR signalling in murine adrenocortical ATC7 cells. Phosphorylated S6K1, rpS6, 4E-BP1, AKT and CREB were detected in cells treated for 15' with insulin and in combination with PKA inhibitor H89 or mTORC1 inhibitor rapamycin. Total S6K1, rpS6, 4E-BP1 and CREB protein signals were unaffected by these short-time treatments (not shown).

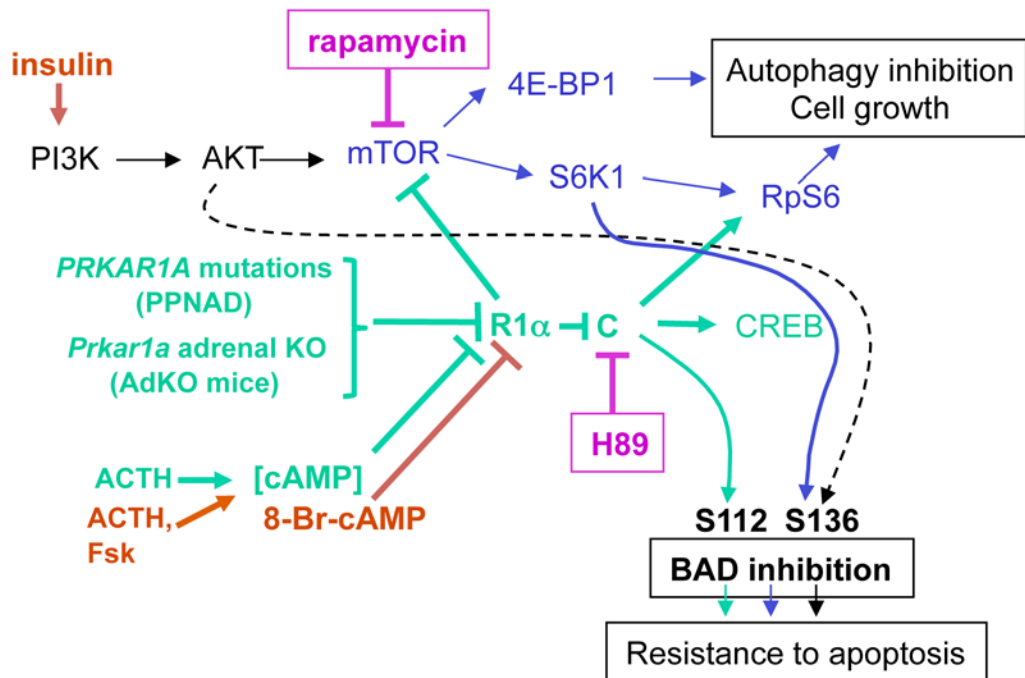
**Supplemental Figure 2.** Hypothetical mechanism of apoptosis resistance in PPNAD. In the absence of excessive AKT activation in PPNAD, BAD phosphorylation (inhibition of its pro-apoptotic action) is likely to depend on PKA activation. Direct phosphorylation on Ser112 is realised by the catalytic subunits of PKA (C) and Ser136 phosphorylation would depend on S6K1 via PKA-dependent activation of mTOR. The pharmacological components that were used in the experiments are shown in red (activators) and pink (inhibitors).



-	+	+	+	Insulin, 100 ng/ml
-	-	+	-	Rapa, 50 nM
-	-	-	+	H89, 5 $\mu$ M











# REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES



- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–3804.
- Abiven, G., Coste, J., Groussin, L., Anract, P., Tissier, F., Legmann, P., Dousset, B., Bertagna, X., and Bertherat, J. (2006). Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2650–2655.
- Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F., and Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 269, 21003–21009.
- Aguilera, G. (2011). HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp. Gerontol.* 46, 90–95.
- Aguilera, O., Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Herranz, M., Espada, J., García, J.M., Muñoz, A., Esteller, M., and González-Sancho, J.M. (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25, 4116–4121.
- Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A.M., Veyssiere, G., and Jean, C.I. (1999). Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J Endocrinol* 160, 147–154.
- Aigueperse, C., Val, P., Pacot, C., Darne, C., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Veyssiere, G., Jean, C., and Martinez, A. (2001). SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 15, 93–111.
- Albert, M., and Helin, K. (2010). Histone methyltransferases in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 209–220.
- Allolio, B., and Fassnacht, M. (2006). Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2027–2037.
- Almeida, M.Q., and Stratakis, C.A. (2010). Carney complex and other conditions associated with micronodular adrenal hyperplasias. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 907–914.
- Amar, L., Plouin, P.-F., and Steichen, O. (2010). Aldosterone-producing adenoma and other surgically correctable forms of primary aldosteronism. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 9.
- Van Amerongen, R., Mikels, A., and Nusse, R. (2008). Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci. Signal.* 1, re9.
- Antonini, S.R., Baldacchino, V., Tremblay, J., Hamet, P., and Lacroix, A. (2006). Expression of ACTH receptor pathway genes in glucose-dependent insulintrophic peptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 64, 29–36.



- Arakane, F., King, S.R., Du, Y., Kallen, C.B., Walsh, L.P., Watari, H., Stocco, D.M., and Strauss, J.F., 3rd (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272, 32656–32662.
- Assié, G., Libé, R., Espiard, S., Rizk-Rabin, M., Guimier, A., Luscap, W., Barreau, O., Lefèvre, L., Sibony, M., Guignat, L., et al. (2013). ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 369, 2105–2114.
- Assié, G., Letouzé, E., Fassnacht, M., Jouinot, A., Luscap, W., Barreau, O., Omeiri, H., Rodriguez, S., Perlemoine, K., René-Corail, F., et al. (2014). Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.* 46, 607–612.
- Avan, A., Crea, F., Paolicchi, E., Funel, N., Galvani, E., Marquez, V.E., Honeywell, R.J., Danesi, R., Peters, G.J., and Giovannetti, E. (2012). Molecular mechanisms involved in the synergistic interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A with gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1735–1746.
- Babu, P.S., Bavers, D.L., Beuschlein, F., Shah, S., Jeffs, B., Jameson, J.L., and Hammer, G.D. (2002). Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* 143, 665–673.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., and Aaronson, S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683–686.
- Bamforth, S.D., Bragança, J., Eloranta, J.J., Murdoch, J.N., Marques, F.I.R., Kranc, K.R., Farza, H., Henderson, D.J., Hurst, H.C., and Bhattacharya, S. (2001). Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator. *Nat. Genet.* 29, 469–474.
- Bandiera, R., Vidal, V.P.I., Motamedi, F.J., Clarkson, M., Sahut-Barnola, I., von Gise, A., Pu, W.T., Hohenstein, P., Martinez, A., and Schedl, A. (2013). WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev. Cell* 27, 5–18.
- Barlaskar, F.M., Spalding, A.C., Heaton, J.H., Kuick, R., Kim, A.C., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Ben-Josef, E., and Hammer, G.D. (2009). Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 204–212.
- Bassett, M.H., Suzuki, T., Sasano, H., White, P.C., and Rainey, W.E. (2004). The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 279–290.
- Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbacher, U., Aragnol, D., Kemler, R., and Pradel, J. (2000). Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J.* 19, 6121–6130.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., et al. (2006). Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. *Dev. Cell* 10, 759–770.



- Bergman, D., Halje, M., Nordin, M., and Engström, W. (2013). Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology* 59, 240–249.
- Berruti, A., Ferrero, A., Sperone, P., Daffara, F., Reimondo, G., Papotti, M., Dogliotti, L., Angeli, A., and Terzolo, M. (2008). Emerging drugs for adrenocortical carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 13, 497–509.
- Bertherat, J., Groussin, L., Sandrini, F., Matyakhina, L., Bei, T., Stergiopoulos, S., Papageorgiou, T., Bourdeau, I., Kirschner, L.S., Vincent-Dejean, C., et al. (2003). Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res* 63, 5308–5319.
- Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefrancois-Martinez, A.M., et al. (2010). Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* 19, 1561–1576.
- Berthon, A., Drelon, C., Ragazzon, B., Boulkroun, S., Tissier, F., Amar, L., Samson-Couterie, B., Zennaro, M.-C., Plouin, P.-F., Skah, S., et al. (2014). WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet.* 23, 889–905.
- Beuschlein, F., Reincke, M., Karl, M., Travis, W., Jaurisch-Hancke, C., Abdelhamid, S., Chrousos, G.P., and Allolio, B. (1994). Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res* 54.
- Beuschlein, F., Boulkroun, S., Osswald, A., Wieland, T., Nielsen, H.N., Lichtenauer, U.D., Penton, D., Schack, V.R., Amar, L., Fischer, E., et al. (2013). Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat. Genet.* 45, 440–444, 444e1–e2.
- Beuschlein, F., Fassnacht, M., Assié, G., Calebiro, D., Stratakis, C.A., Osswald, A., Ronchi, C.L., Wieland, T., Sbiera, S., Faucz, F.R., et al. (2014). Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 370, 1019–1028.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.-C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225–230.
- Bhattacharya, S., Michels, C.L., Leung, M.K., Arany, Z.P., Kung, A.L., and Livingston, D.M. (1999). Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13, 64–75.
- Biliya, S., and Bulla, L.A., Jr. (2010). Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. *Exp Biol Med Maywood* 235, 139–147.
- Bingham, N.C., Verma-Kurvari, S., Parada, L.F., and Parker, K.L. (2006). Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 44, 419–424.





- Binnerts, M.E., Kim, K.-A., Bright, J.M., Patel, S.M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J.M., Liu, Y., Lomas, W.E., Dixon, M., et al. (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14700–14705.
- Bland, M.L., Fowkes, R.C., and Ingraham, H.A. (2004). Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. *Mol Endocrinol* *18*, 941–952.
- Boland, G.W.L., Blake, M.A., Hahn, P.F., and Mayo-Smith, W.W. (2008). Incidental adrenal lesions: principles, techniques, and algorithms for imaging characterization. *Radiology* *249*, 756–775.
- Bonnet, S., Gaujoux, S., Launay, P., Baudry, C., Chokri, I., Ragazzon, B., Libe, R., Rene-Corail, F., Audebourg, A., Vacher-Lavenu, M.C., et al. (2011). Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab* *96*, E419–E426.
- Bornfeldt, K.E., and Krebs, E.G. (1999). Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell. Signal.* *11*, 465–477.
- Bose, H., Lingappa, V.R., and Miller, W.L. (2002). Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* *417*, 87–91.
- Boulkroun, S., Beuschlein, F., Rossi, G.-P., Golib-Dzib, J.-F., Fischer, E., Amar, L., Mulatero, P., Samson-Couterie, B., Hahner, S., Quinkler, M., et al. (2012). Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension* *59*, 592–598.
- Boulle, N., Logie, A., Gicquel, C., Perin, L., and Le Bouc, Y. (1998). Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* *83*, 1713–1720.
- Bourcigaux, N., Gaston, V., Logié, A., Bertagna, X., Le Bouc, Y., and Gicquel, C. (2000). High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 322–330.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* *121*, 737–746.
- Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J* *22*, 5323–5335.
- Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M., and Clevers, H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res.* *29*, 1410–1419.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D.H., McMahon, A.P., Sommer, L., Boussadia, O., and Kemler, R. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-



mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 1253–1264.

Brembeck, F.H., Rosário, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of  $\beta$ -catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *16*, 51–59.

Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., and Riethmacher, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* *12*, 1825–1836.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* *232*, 34–47.

Brudvik, K.W., Paulsen, J.E., Aandahl, E.M., Roald, B., and Taskén, K. (2011). Protein kinase A antagonist inhibits  $\beta$ -catenin nuclear translocation, c-Myc and COX-2 expression and tumor promotion in Apc(Min/+) mice. *Mol. Cancer* *10*, 149.

Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *14*, 155–164.

Cao, Y., He, M., Gao, Z., Peng, Y., Li, Y., Li, L., Zhou, W., Li, X., Zhong, X., Lei, Y., et al. (2014). Activating hotspot L205R mutation in PRKACA and adrenal Cushing's syndrome. *Science* *344*, 913–917.

Capponi, A.M. (2002). Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. *Trends Endocrinol Metab* *13*, 118–121.

Carden, C.P., Kim, E.S., Jones, R.L., Alam, S.M., Johnson, F.M., Stephens, A.W., Poondru, S., Gedrich, R., Lippman, S.M., and Kaye, S.B. (2010). Phase I study of intermittent dosing of OSI-906, a dual tyrosine kinase inhibitor of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF- 1R) and insulin receptor (IR) in patients with advanced solid tumors. *ASCO Meet. Abstr.* *28*, 2530.

Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11452–11457.

Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., and Parker, K.L. (1997). Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U A* *94*, 11540–11545.

Carretero, O.A., and Oparil, S. (2000). Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* *101*, 329–335.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. (1998). *Drosophila* Tef and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* *395*, 604–608.

Cazabat, L., Ragazzon, B., Groussin, L., and Bertherat, J. (2006). PRKAR1A mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Pituitary* *9*, 211–219.



- Cha, T.-L., Zhou, B.P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C.-C., Chen, C.-T., Ping, B., Otte, A.P., and Hung, M.-C. (2005). Akt-Mediated Phosphorylation of EZH2 Suppresses Methylation of Lysine 27 in Histone H3. *Science* 310, 306–310.
- Chang, C.J., and Hung, M.C. The role of EZH2 in tumour progression. *Br J Cancer* 106, 243–247.
- Chao, W., and D’Amore, P.A. (2008). IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 111–120.
- Chase, A., and Cross, N.C.P. (2011). Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 2613–2618.
- Cherradi, N., Bideau, M., Arnaudeau, S., Demaurex, N., James, R.W., Azhar, S., and Capponi, A.M. (2001). Angiotensin II promotes selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in bovine adrenal glomerulosa and human adrenocortical carcinoma cells through induction of scavenger receptor class B type I. *Endocrinology* 142, 4540–4549.
- Chida, D., Nakagawa, S., Nagai, S., Sagara, H., Katsumata, H., Imaki, T., Suzuki, H., Mitani, F., Ogishima, T., Shimizu, C., et al. (2007). Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18205–18210.
- Ching, S., and Vilain, E. (2009). Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genes. N. Y. N* 2000 47, 628–637.
- Chiong, J.R., Aronow, W.S., Khan, I.A., Nair, C.K., Vijayaraghavan, K., Dart, R.A., Behrenbeck, T.R., and Geraci, S.A. (2008). Secondary hypertension: Current diagnosis and treatment. *Int. J. Cardiol.* 124, 6–21.
- Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., Björklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C.J., et al. (2011). K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331, 768–772.
- Chou, Y.-T., Wang, H., Chen, Y., Danielpour, D., and Yang, Y.-C. (2006). Cited2 modulates TGF-beta-mediated upregulation of MMP9. *Oncogene* 25, 5547–5560.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A.P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L., and Helin, K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res.* 33, 5458–5470.
- Clark, A.J., McLoughlin, L., and Grossman, A. (1993). Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet* 341, 461–462.
- Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., and Stocco, D.M. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269, 28314–28322.
- Clark, C.E.J., Nourse, C.C., and Cooper, H.M. (2012). The tangled web of non-canonical Wnt signalling in neural migration. *Neurosignals* 20, 202–220.



- Clemmons, D.R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 45–62.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205.
- Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769–776.
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest* 84, 1619–1630.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a015081.
- Cui, S., Ross, A., Stallings, N., Parker, K.L., Capel, B., and Quaggin, S.E. (2004). Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development* 131, 4095–4105.
- Dall'Asta, C., Ballarè, E., Mantovani, G., Ambrosi, B., Spada, A., Barbetta, L., Colombo, P., Travaglini, P., Loli, P., and Beck-Peccoz, P. (2004). Assessing the Presence of Abnormal Regulation of Cortisol Secretion by Membrane Hormone Receptors: *In Vivo* and *In Vitro* Studies in Patients with Functioning and Non-functioning Adrenal Adenoma. *Horm. Metab. Res.* 36, 578–583.
- Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005).  $\beta$ -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 364–371.
- Dann, C.E., Hsieh, J.C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J., and Leahy, D.J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 412, 86–90.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867–872.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., et al. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev.* 21, 2923–2935.
- Deng, Q., Wang, Q., Zong, W.-Y., Zheng, D.-L., Wen, Y.-X., Wang, K.-S., Teng, X.-M., Zhang, X., Huang, J., and Han, Z.-G. (2010). E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res.* 70, 782–791.





Diaz-Meyer, N., Day, C.D., Khatod, K., Maher, E.R., Cooper, W., Reik, W., Junien, C., Graham, G., Algar, E., Kaloustian, V.M.D., et al. (2003). Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith–Wiedemann syndrome. *J. Med. Genet.* 40, 797–801.

De Diego, A.M.G., Gandía, L., and García, A.G. (2008). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 192, 287–301.

Ding, Q., Xia, W., Liu, J.C., Yang, J.Y., Lee, D.F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., et al. (2005). Erk associates with and primes GSK-3 $\beta$  for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* 19, 159–170.

Doghman, M., Arhatte, M., Thibout, H., Rodrigues, G., De Moura, J., Grosso, S., West, A.N., Laurent, M., Mas, J.C., Bongain, A., et al. (2007a). Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 3253–3260.

Doghman, M., Karpova, T., Rodrigues, G.A., Arhatte, M., De Moura, J., Cavalli, L.R., Virolle, V., Barbry, P., Zambetti, G.P., Figueiredo, B.C., et al. (2007b). Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 21, 2968–2987.

Doghman, M., Cazareth, J., and Lalli, E. (2008). The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3222–3225.

Drelon, C., Berthon, A., Ragazzon, B., Tissier, F., Bandiera, R., Sahut-Barnola, I., de Joussineau, C., Batisse-Lignier, M., Lefrançois-Martinez, A.-M., Bertherat, J., et al. (2012). Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models. *PLoS ONE* 7, e44171.

Drelon, C., Berthon, A., and Val, P. (2013). Adrenocortical cancer and IGF2: is the game over or our experimental models limited? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 505–507.

Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2625–2634.

Duarte, A., Castillo, A.F., Podestá, E.J., and Poderoso, C. (2014). Mitochondrial Fusion and ERK Activity Regulate Steroidogenic Acute Regulatory Protein Localization in Mitochondria. *PloS One* 9, e100387.

Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin, null, and Byers, S. (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr. Biol. CB* 9, 1415–1418.

Eggenchwiler, J., Ludwig, T., Fisher, P., Leighton, P.A., Tilghman, S.M., and Efstratiadis, A. (1997). Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith–Wiedemann and Simpson–Golabi–Behmel syndromes. *Genes Dev* 11, 3128–3142.



- Ehrlund, A., Jonsson, P., Vedin, L.-L., Williams, C., Gustafsson, J.-Å., and Treuter, E. (2012). Knockdown of SF-1 and RNF31 affects components of steroidogenesis, TGF $\beta$ , and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in adrenocortical carcinoma cells. *PloS One* 7, e32080.
- Elliott, M., Bayly, R., Cole, T., Temple, I.K., and Maher, E.R. (1994). Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin. Genet.* 46, 168–174.
- Else, T. (2012). Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 66–70.
- Else, T., and Hammer, G.D. (2005). Genetic analysis of adrenal absence:agenesis and aplasia. *Trends Endocrinol Metab* 16, 458–468.
- Else, T., Kim, A.C., Sabolch, A., Raymond, V.M., Kandathil, A., Caoili, E.M., Jolly, S., Miller, B.S., Giordano, T.J., and Hammer, G.D. (2014). Adrenocortical carcinoma. *Endocr. Rev.* 35, 282–326.
- Elston, M.S., Gill, A.J., Conaglen, J.V., Clarkson, A., Shaw, J.M., Law, A.J.J., Cook, R.J., Little, N.S., Clifton-Bligh, R.J., Robinson, B.G., et al. (2008). Wnt Pathway Inhibitors Are Strongly Down-Regulated in Pituitary Tumors. *Endocrinology* 149, 1235–1242.
- Engström, W., Shokrai, A., Otte, K., Granérus, M., Gessbo, A., Bierke, P., Madej, A., Sjölund, M., and Ward, A. (1998). Transcriptional regulation and biological significance of the insulin like growth factor II gene. *Cell Prolif.* 31, 173–189.
- Estivariz, F.E., Iturriza, F., McLean, C., Hope, J., and Lowry, P.J. (1982). Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. *Nature* 297, 419–422.
- Evinger, M.J., Towle, A.C., Park, D.H., Lee, P., and Joh, T.H. (1992). Glucocorticoids stimulate transcription of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) gene in vivo and in vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* 12, 193–215.
- Von Eyss, B., Maaskola, J., Memczak, S., Möllmann, K., Schuetz, A., Loddenkemper, C., Tanh, M.-D., Otto, A., Muegge, K., Heinemann, U., et al. (2012). The SNF2-like helicase HELLS mediates E2F3-dependent transcription and cellular transformation. *EMBO J.* 31, 972–985.
- Fagotto, F., Guger, K., and Gumbiner, B.M. (1997). Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/GSK/ $\beta$ -catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. *Development* 124, 453–460.
- Fagugli, R.M., and Taglioni, C. (2011). Changes in the perceived epidemiology of primary hyperaldosteronism. *Int. J. Hypertens.* 2011, 162804.
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). Phosphorylation of  $\beta$ -catenin by AKT promotes  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282, 11221–11229.
- Fang, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast, R.C., Jr., Woodgett, J.R., and Mills, G.B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11960–11965.



- Fassnacht, M., Johanssen, S., Quinkler, M., Bucskey, P., Willenberg, H.S., Beuschlein, F., Terzolo, M., Mueller, H.-H., Hahner, S., Allolio, B., et al. (2009). Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer* 115, 243–250.
- Fassnacht, M., Libé, R., Kroiss, M., and Allolio, B. (2011). Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 323–335.
- Fassnacht, M., Terzolo, M., Allolio, B., Baudin, E., Haak, H., Berruti, A., Welin, S., Schade-Brittinger, C., Lacroix, A., Jarzab, B., et al. (2012). Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 366, 2189–2197.
- Fatchiyah, Zubair, M., Shima, Y., Oka, S., Ishihara, S., Fukui-Katoh, Y., and Morohashi, K. (2006). Differential gene dosage effects of Ad4BP/SF-1 on target tissue development. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1036–1045.
- Fay, A.P., Elfiky, A., Teló, G.H., McKay, R.R., Kaymakcalan, M., Nguyen, P.L., Vaidya, A., Ruan, D.T., Bellmunt, J., and Choueiri, T.K. (2014). Adrenocortical carcinoma: The management of metastatic disease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/ $\beta$ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559.
- Fitzpatrick, G.V., Soloway, P.D., and Higgins, M.J. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat. Genet.* 32, 426–431.
- França, M.M., Ferraz-de-Souza, B., Santos, M.G., Lerario, A.M., Frago, M.C.B.V., Latronico, A.C., Kuick, R.D., Hammer, G.D., and Lotfi, C.F.P. (2013). POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 371, 140–147.
- De Francia, S., Ardito, A., Daffara, F., Zaggia, B., Germano, A., Berruti, A., and Di Carlo, F. (2012). Mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: an overview. *Minerva Endocrinol.* 37, 9–23.
- Freedman, B.D., Kempna, P.B., Carlone, D.L., Shah, M.S., Guagliardo, N.A., Barrett, P.Q., Gomez-Sanchez, C.E., Majzoub, J.A., and Breault, D.T. (2013). Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev. Cell* 26, 666–673.
- Fuchs-Hammoser, R., Schweiger, M., and Oelkers, W. (1980). The effect of chronic low-dose infusion of ACTH (1-24) on renin, renin-substrate, aldosterone and other corticosteroids in sodium replete and deplete man. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 95, 198–206.
- Furukawa, T., Kuboki, Y., Tanji, E., Yoshida, S., Hatori, T., Yamamoto, M., Shibata, N., Shimizu, K., Kamatani, N., and Shiratori, K. (2011). Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci. Rep.* 1, 161.
- Gao, B. (2012). Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr. Top. Dev. Biol.* 101, 263–295.



- Gaujoux, S., Tissier, F., Groussin, L., Libe, R., Ragazzon, B., Launay, P., Audebourg, A., Dousset, B., Bertagna, X., and Bertherat, J. (2008). Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4135–4140.
- Gaujoux, S., Grabar, S., Fassnacht, M., Ragazzon, B., Launay, P., Libe, R., Chokri, I., Audebourg, A., Royer, B., Sbiera, S., et al. (2011). beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res* 17, 328–336.
- Gaujoux, S., Hantel, C., Launay, P., Bonnet, S., Perlemoine, K., Lefèvre, L., Guillaud-Bataille, M., Beuschlein, F., Tissier, F., Bertherat, J., et al. (2013). Silencing mutated  $\beta$ -catenin inhibits cell proliferation and stimulates apoptosis in the adrenocortical cancer cell line H295R. *PloS One* 8, e55743.
- Gicquel, C., Leblond-Francillard, M., Bertagna, X., Louvel, A., Chapuls, Y., Luton, J.P., Girard, F., and Le Bouc, Y. (1994). Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol Oxf* 40, 465–477.
- Gicquel, C., Baudin, E., Le Bouc, Y., and Schlumberger, M. (1997a). Adrenal carcinoma. *Ann Oncol* 8, 1–5.
- Gicquel, C., , Raffin-Sanson, M., Gaston, V., Bertagna, X., Plouin, P.F., Schlumberger, M., Louvel, A., Luton, J.P., and Le Bouc, Y. (1997b). Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors : study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2559–2565.
- Gicquel, C., Bertagna, X., Gaston, V., Coste, J., Louvel, A., Baudin, E., Bertherat, J., Chapuis, Y., Duclos, J.M., Schlumberger, M., et al. (2001). Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* 61, 6762–6767.
- Giordano, T.J., Thomas, D.G., Kuick, R., Lizyness, M., Misek, D.E., Smith, A.L., Sanders, D., Aljundi, R.T., Gauger, P.G., Thompson, N.W., et al. (2003). Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* 162, 521–531.
- Girard, N., Bazille, C., Lhuissier, E., Benateau, H., Llombart-Bosch, A., Boumediene, K., and Bauge, C. (2014). 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PloS One* 9, e98176.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.-L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2011). LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 12, 1055–1061.
- Goh, G., Scholl, U.I., Healy, J.M., Choi, M., Prasad, M.L., Nelson-Williams, C., Kunstman, J.W., Kuntsman, J.W., Korah, R., Suttorp, A.-C., et al. (2014). Recurrent activating mutation in PRKACA in cortisol-producing adrenal tumors. *Nat. Genet.* 46, 613–617.





- Gomes, D.C., Leal, L.F., Mermejo, L.M., Scrideli, C.A., Martinelli, C.E., Fragoso, M.C.B.V., Latronico, A.C., Tone, L.G., Tucci, S., Yunes, J.A., et al. (2014). Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E1209–E1216.
- Gorrigan, R.J., Guasti, L., King, P., Clark, A.J., and Chan, L.F. (2011). Localisation of the melanocortin-2-receptor and its accessory proteins in the developing and adult adrenal gland. *J. Mol. Endocrinol.* *46*, 227–232.
- Gregorieff, A., and Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* *19*, 877–890.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* *129*, 626–638.
- Groussin, L., Kirschner, L.S., Vincent-Dejean, C., Perlemoine, K., Jullian, E., Delemer, B., Zacharieva, S., Pignatelli, D., Carney, J.A., Luton, J.P., et al. (2002). Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet* *71*, 1433–1442.
- Grumbach, M.M., Biller, B.M., Braunstein, G.D., Campbell, K.K., Carney, J.A., Godley, P.A., Harris, E.L., Lee, J.K., Oertel, Y.C., Posner, M.C., et al. (2003). Management of the clinically inapparent adrenal mass (“incidentaloma”). *Ann Intern Med* *138*, 424–429.
- Guaraldi, F., and Salvatori, R. (2012). Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease. *J. Am. Board Fam. Med. JABFM* *25*, 199–208.
- Guasti, L., Cavlan, D., Cogger, K., Banu, Z., Shakur, A., Latif, S., and King, P.J. (2013). Dlk1 up-regulates Gli1 expression in male rat adrenal capsule cells through the activation of  $\beta$ 1 integrin and ERK1/2. *Endocrinology* *154*, 4675–4684.
- Guillaud-Bataille, M., Ragazzon, B., de Reyniès, A., Chevalier, C., Francillard, I., Barreau, O., Steunou, V., Guillemot, J., Tissier, F., Rizk-Rabin, M., et al. (2014). IGF2 promotes growth of adrenocortical carcinoma cells, but its overexpression does not modify phenotypic and molecular features of adrenocortical carcinoma. *PloS One* *9*, e103744.
- Gummow, B.M., Winnay, J.N., and Hammer, G.D. (2003). Convergence of Wnt signaling and steroidogenic factor-1 (SF-1) on transcription of the rat inhibin alpha gene. *J Biol Chem* *278*, 26572–26579.
- Guo, J., Cai, J., Yu, L., Tang, H., Chen, C., and Wang, Z. (2011). EZH2 regulates expression of p57 and contributes to progression of ovarian cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* *102*, 530–539.
- Gwynne, J.T., and Hess, B. (1980). The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. *J Biol Chem* *255*, 10875–10883.
- Gwynne, J.T., Hess, B., Hughes, T., Rountree, R., and Mahaffee, D. (1984). The role of serum high density lipoproteins in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* *10*, 411–430.



- Haidan, A., Bornstein, S.R., Glasow, A., Uhlmann, K., Lübke, C., and Ehrhart-Bornstein, M. (1998). Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology* 139, 772–780.
- Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J. Rare Dis.* 4, 22.
- Haluska, P., Worden, F., Olmos, D., Yin, D., Schteingart, D., Batzel, G.N., Paccagnella, M.L., de Bono, J.S., Gualberto, A., and Hammer, G.D. (2010). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 765–773.
- Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., et al. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195–200.
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo J* 18, 5931–5942.
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20, 154–159.
- Hasegawa, T., Zhao, L., Caron, K.M., Majdic, G., Suzuki, T., Shizawa, S., Sasano, H., and Parker, K.L. (2000). Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol* 14, 1462–1471.
- Hassan, A.B. (2003). Keys to the hidden treasures of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Am. J. Pathol.* 162, 3–6.
- Hassan, A.B., and Howell, J.A. (2000). Insulin-like growth factor II supply modifies growth of intestinal adenoma in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res* 60, 1070–1076.
- Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., and Morohashi, K. (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells* 1, 663–671.
- Hattangady, N.G., Olala, L.O., Bollag, W.B., and Rainey, W.E. (2012). Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350, 151–162.
- He, A., Ma, Q., Cao, J., von Gise, A., Zhou, P., Xie, H., Zhang, B., Hsing, M., Christodoulou, D.C., Cahan, P., et al. (2012). Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart. *Circ. Res.* 110, 406–415.
- Heaton, J.H., Wood, M.A., Kim, A.C., Lima, L.O., Barlaskar, F.M., Almeida, M.Q., Fragoso, M.C.B.V., Kuick, R., Lerario, A.M., Simon, D.P., et al. (2012). Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and  $\beta$ -catenin. *Am. J. Pathol.* 181, 1017–1033.
- Heikkilä, M., Peltoketo, H., Leppaluoto, J., Ilves, M., Vuolteenaho, O., and Vainio, S. (2002). Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* 143, 4358–4365.



- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saúde, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76–81.
- Henderson, B.R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat. Cell Biol.* 2, 653–660.
- Hendriksen, J., Fagotto, F., van der Velde, H., van Schie, M., Noordermeer, J., and Fornerod, M. (2005). RanBP3 enhances nuclear export of active (beta)-catenin independently of CRM1. *J. Cell Biol.* 171, 785–797.
- Hermesen, I.G., Fassnacht, M., Terzolo, M., Houterman, S., den Hartigh, J., Lebouilleux, S., Daffara, F., Berruti, A., Chadarevian, R., Schlumberger, M., et al. (2011). Plasma concentrations of o,p’DDD, o,p’DDA, and o,p’DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1844–1851.
- Herrera-Merchan, A., Arranz, L., Ligos, J.M., de Molina, A., Dominguez, O., and Gonzalez, S. (2012). Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. *Nat. Commun.* 3, 623.
- Hershkovitz, L., Beuschlein, F., Klammer, S., Krup, M., and Weinstein, Y. (2007). Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. *Endocrinology* 148, 976–988.
- Hescot, S., Slama, A., Lombès, A., Paci, A., Remy, H., Lebouilleux, S., Chadarevian, R., Trabado, S., Amazit, L., Young, J., et al. (2013). Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. *Endocr. Relat. Cancer* 20, 371–381.
- Higashijima, M., Nawata, H., Kato, K., and Ibayashi, H. (1987). Studies on lipoprotein and adrenal steroidogenesis: I. Roles of low density lipoprotein- and high density lipoprotein-cholesterol in steroid production in cultured human adrenocortical cells. *Endocrinol Jpn* 34, 635–645.
- Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K.I., and Kikuchi, A. (2005). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* 25, 9063–9072.
- Hoeflich, A., Fetscher, O., Lahm, H., Blum, W.F., Kolb, H.J., Engelhardt, D., Wolf, E., and Weber, M.M. (2000). Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res* 60, 834–838.
- Holland, O.B., and Carr, B. (1993). Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. *Endocrinology* 132, 2666–2673.
- Holland, J.D., Klaus, A., Garratt, A.N., and Birchmeier, W. (2013). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 254–264.



- Holmen, S.L., Salic, A., Zylstra, C.R., Kirschner, M.W., and Williams, B.O. (2002). A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate beta -catenin-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 34727–34735.
- Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M., and Omura, T. (1993). Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* 268, 7494–7502.
- Horvath, A., and Stratakis, C. (2007). Primary pigmented nodular adrenocortical disease and Cushing’s syndrome. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 51, 1238–1244.
- Horvath, A., Giatzakis, C., Robinson-White, A., Boikos, S., Levine, E., Griffin, K., Stein, E., Kamvissi, V., Soni, P., Bossis, I., et al. (2006). Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res* 66, 11571–11575.
- Horvath, A., Giatzakis, C., Tsang, K., Greene, E., Osorio, P., Boikos, S., Libè, R., Patronas, Y., Robinson-White, A., Remmers, E., et al. (2008). A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 16, 1245–1253.
- Hottiger, M.O., Felzien, L.K., and Nabel, G.J. (1998). Modulation of cytokine-induced HIV gene expression by competitive binding of transcription factors to the coactivator p300. *EMBO J.* 17, 3124–3134.
- Huang, C.-C.J., Miyagawa, S., Matsumaru, D., Parker, K.L., and Yao, H.H.-C. (2010). Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology* 151, 1119–1128.
- Huang, C.-C.J., Liu, C., and Yao, H.H.-C. (2012). Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 361, 165–171.
- Iannetti, A., Ledoux, A.C., Tudhope, S.J., Sellier, H., Zhao, B., Mowla, S., Moore, A., Hummerich, H., Gewurz, B.E., Cockell, S.J., et al. (2014). Regulation of p53 and Rb Links the Alternative NF-κB Pathway to EZH2 Expression and Cell Senescence. *PLoS Genet* 10, e1004642.
- Iaquinta, P.J., and Lees, J.A. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 649–657.
- Icard, P., Goudet, P., Charpenay, C., Andreassian, B., Carnaille, B., Chapuis, Y., Cougard, P., Henry, J.F., and Proye, C. (2001). Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg* 25, 891–897.
- Ingham, P.W., Nakano, Y., and Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* 12, 393–406.
- Jamieson, C., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2014). Targeting the β-catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin. Cancer Biol.*





- Jiang, X., Hao, H.-X., Growney, J.D., Woolfenden, S., Bottiglio, C., Ng, N., Lu, B., Hsieh, M.H., Bagdasarian, L., Meyer, R., et al. (2013). Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12649–12654.
- Jocken, J.W.E., and Blaak, E.E. (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* *94*, 219–230.
- De Joussineau, C., Sahut-Barnola, I., Levy, I., Saloustros, E., Val, P., Stratakis, C.A., and Martinez, A. (2012). The cAMP pathway and the control of adrenocortical development and growth. *Mol. Cell. Endocrinol.* *351*, 28–36.
- De Joussineau, C., Sahut-Barnola, I., Tissier, F., Dumontet, T., Drelon, C., Batisse-Lignier, M., Tauveron, I., Pointud, J.-C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Stratakis, C.A., et al. (2014). mTOR pathway is activated by PKA in adrenocortical cells and participates in vivo to apoptosis resistance in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). *Hum. Mol. Genet.*
- Kang, D.E., Soriano, S., Xia, X., Eberhart, C.G., De Strooper, B., Zheng, H., and Koo, E.H. (2002). Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* *110*, 751–762.
- Karanikolas, B.D.W., Figueiredo, M.L., and Wu, L. (2010). Comprehensive evaluation of the role of EZH2 in the growth, invasion, and aggression of a panel of prostate cancer cell lines. *The Prostate* *70*, 675–688.
- Karpac, J., Kern, A., and Hochgeschwender, U. (2007). Pro-opiomelanocortin peptides and the adrenal gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* *265-266*, 29–33.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* *116*, 2627–2634.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev. Cell* *7*, 525–534.
- Keegan, C.E., and Hammer, G.D. (2002). Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab* *13*, 200–208.
- Keeney, D.S., Jenkins, C.M., and Waterman, M.R. (1995). Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. *Endocrinology* *136*, 4872–4879.
- Kelly-HersHKovitz, E., Weizman, R., Spanier, I., Leschiner, S., Lahav, M., Weisinger, G., and Gavish, M. (1998). Effects of peripheral-type benzodiazepine receptor antisense knockout on MA-10 Leydig cell proliferation and steroidogenesis. *J Biol Chem* *273*, 5478–5483.
- Khattak, M.N.K., Buchfelder, M., Kleindienst, A., Schöfl, C., and Kremenevskaja, N. (2010). CRH and SRIF have opposite effects on the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway through PKA/GSK-3 $\beta$  in corticotroph pituitary cells. *Cancer Invest.* *28*, 797–805.



- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *291*, 21–71.
- Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L., and Hammer, G.D. (2008a). Targeted disruption of  $\beta$ -catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development*.
- Kim, A.C., Barlasakar, F.M., Heaton, J.H., Else, T., Kelly, V.R., Krill, K.T., Scheys, J.O., Simon, D.P., Trovato, A., Yang, W.H., et al. (2009). In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev* *30*, 241–263.
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., et al. (2013). Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell* *23*, 839–852.
- Kim, K.-A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., et al. (2005). Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* *309*, 1256–1259.
- Kim, K.-A., Kim, J.-H., Wang, Y., and Sul, H.S. (2007). Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 2294–2308.
- Kim, K.-A., Wagle, M., Tran, K., Zhan, X., Dixon, M.A., Liu, S., Gros, D., Korver, W., Yonkovich, S., Tomasevic, N., et al. (2008b). R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2588–2596.
- King, P., Paul, A., and Laufer, E. (2009). Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 21185–21190.
- King, P.J., Guasti, L., and Laufer, E. (2008). Hedgehog signalling in endocrine development and disease. *J Endocrinol* *198*, 439–450.
- Kirschner, L.S. (2012). The next generation of therapies for adrenocortical cancers. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *23*, 343–350.
- Kirschner, L.S., Carney, J.A., Pack, S.D., Taymans, S.E., Giatzakis, C., Cho, Y.S., Cho-Chung, Y.S., and Stratakis, C.A. (2000). Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* *26*, 89–92.
- Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., Hayes, D.F., et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11606–11611.
- Knethen, A. von, Tzieply, N., Jennewein, C., and Brüne, B. (2010). Casein-kinase-II-dependent phosphorylation of PPAR $\gamma$  provokes CRM1-mediated shuttling of PPAR $\gamma$  from the nucleus to the cytosol. *J. Cell Sci.* *123*, 192–201.



- Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C.J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., et al. (2013). Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7922–7927.
- Knutson, S.K., Kawano, S., Minoshima, Y., Warholic, N.M., Huang, K.-C., Xiao, Y., Kadowaki, T., Uesugi, M., Kuznetsov, G., Kumar, N., et al. (2014). Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 842–854.
- Komekado, H., Yamamoto, H., Chiba, T., and Kikuchi, A. (2007). Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *12*, 521–534.
- Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., van de Wetering, M., van Es, J.H., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., et al. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* *488*, 665–669.
- Kovanen, P.T., Goldstein, J.L., Chappell, D.A., and Brown, M.S. (1980). Regulation of low density lipoprotein receptors by adrenocorticotropin in the adrenal gland of mice and rats in vivo. *J Biol Chem* *255*, 5591–5598.
- Krieger, M., and Herz, J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* *63*, 601–637.
- Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.-T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., and Kuo, C.J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 266–271.
- Kuphal, F., and Behrens, J. (2006). E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts. *Exp. Cell Res.* *312*, 457–467.
- Kurayoshi, M., Yamamoto, H., Izumi, S., and Kikuchi, A. (2007). Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem. J.* *402*, 515–523.
- Lacroix, A. (2009). ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *23*, 245–259.
- Lacroix, A., Bourdeau, I., Lampron, A., Mazzuco, T.L., Tremblay, J., and Hamet, P. (2010). Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *73*, 1–15.
- Lala, D.S., Rice, D.A., and Parker, K.L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* *6*, 1249–1258.



- Lambert-Langlais, S., Val, P., Guyot, S., Ragazzon, B., Sahut-Barnola, I., De Haze, A., Dechelotte, P., Lefrançois Martinez, A.M., and Martinez, A. (2008). A Transgenic Mouse Line with Specific Cre Recombinase Expression in The Adrenal Cortex. *Genesis Submitted*.
- Lambert-Langlais, S., Pointud, J.-C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Volat, F., Manin, M., Coudoré, F., Val, P., Sahut-Barnola, I., Ragazzon, B., Louiset, E., et al. (2009). Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions. *PloS One* 4, e7309.
- Latronico, A.C., and Chrousos, G.P. (1997). Extensive personal experience : adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1317–1324.
- Lau, S.K., and Weiss, L.M. (2009). The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum. Pathol.* 40, 757–768.
- De Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293–297.
- De Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* 28, 305–316.
- Laufer, E., Kesper, D., Vortkamp, A., and King, P. (2012). Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 19–27.
- Law, N.C., Weck, J., Kyriakos, B., Nilson, J.H., and Hunzicker-Dunn, M. (2013). Lhcgr expression in granulosa cells: roles for PKA-phosphorylated  $\beta$ -catenin, TCF3, and FOXO1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27, 1295–1310.
- Leboulleux, S., Gaston, V., Boule, N., Le Bouc, Y., and Gicquel, C. (2001). Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Endocrinol* 144, 163–168.
- Lee, J.-K., and Kim, K.-C. (2013). DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 647–652.
- Lee, J.T., and Gu, W. (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ.* 17, 86–92.
- Lee, G., Makhanova, N., Caron, K., Lopez, M.L.S., Gomez, R.A., Smithies, O., and Kim, H.-S. (2005). Homeostatic responses in the adrenal cortex to the absence of aldosterone in mice. *Endocrinology* 146, 2650–2656.
- Lefrançois-Martinez, A.M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssiere, G., and Jean, C. (1999). Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 274, 32875–32880.
- Lefrançois-Martinez, A.M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Veyssiere, G., Jean, C., and Martinez, A. (2004). Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated





aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3010–3019.

Lehoux, J.G., and Lefebvre, A. (1991). Short-term effects of ACTH on the low-density lipoprotein receptor mRNA level in rat and hamster adrenals. *J Mol Endocrinol* 6, 223–230.

Lerario, A.M., Moraitis, A., and Hammer, G.D. (2014a). Genetics and epigenetics of adrenocortical tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 386, 67–84.

Lerario, A.M., Worden, F.P., Ramm, C.A., Hasseltine, E.A., Stadler, W.M., Else, T., Shah, M.H., Agamah, E., Rao, K., and Hammer, G.D. (2014b). The Combination of Insulin-Like Growth Factor Receptor 1 (IGF1R) Antibody Cixutumumab and Mitotane as a First-Line Therapy for Patients with Recurrent/Metastatic Adrenocortical Carcinoma: a Multi-institutional NCI-Sponsored Trial. *Horm. Cancer* 5, 232–239.

Li, V.S.W., Ng, S.S., Boersema, P.J., Low, T.Y., Karthaus, W.R., Gerlach, J.P., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., Mahmoudi, T., et al. (2012). Wnt Signaling through Inhibition of  $\beta$ -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* 149, 1245–1256.

Li, X., Gonzalez, M.E., Toy, K., Filzen, T., Merajver, S.D., and Kleer, C.G. (2009). Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 175, 1246–1254.

Libe, R., Groussin, L., Tissier, F., Elie, C., Rene-Corail, F., Fratticci, A., Jullian, E., Beck-Peccoz, P., Bertagna, X., Gicquel, C., et al. (2007). Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res* 13, 844–850.

Lin, C.-W., Chang, Y.-H., and Pu, H.-F. (2012). Mitotane exhibits dual effects on steroidogenic enzymes gene transcription under basal and cAMP-stimulating microenvironments in NCI-H295 cells. *Toxicology* 298, 14–23.

Lin, K., Wang, S., Julius, M.A., Kitajewski, J., Moos, M., and Luyten, F.P. (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11196–11200.

Lin, Y.-W., Ren, L.-L., Xiong, H., Du, W., Yu, Y.-N., Sun, T.-T., Weng, Y.-R., Wang, Z.-H., Wang, J.-L., Wang, Y.-C., et al. (2013). Role of STAT3 and vitamin D receptor in EZH2-mediated invasion of human colorectal cancer. *J. Pathol.* 230, 277–290.

Liu, B., Shats, I., Angus, S.P., Gatza, M.L., and Nevins, J.R. (2013). Interaction of E2F7 transcription factor with E2F1 and C-terminal-binding protein (CtBP) provides a mechanism for E2F7-dependent transcription repression. *J. Biol. Chem.* 288, 24581–24589.

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837–847.

Liu, J., Heikkila, P., Meng, Q.H., Kahri, A.I., Tikkanen, M.J., and Voutilainen, R. (2000a). Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals. *Eur J Endocrinol* 142, 677–682.



- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Boardman, L.A., Qian, C., et al. (2000b). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat. Genet.* 26, 146–147.
- Lotfi, C.F., and Armelin, H.A. (1998). c-Fos protein is a mediator in mitogenic response to ACTH. *Endocr. Res.* 24, 421–424.
- Louisset, E., Duparc, C., Young, J., Renouf, S., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Libé, R., Bram, Z., Groussin, L., Caron, P., et al. (2013). Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 369, 2115–2125.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481–490.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.
- Maki, R.G. (2010). Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol* 28, 4985–4995.
- Mancini-DiNardo, D., Steele, S.J.S., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (2003). A differentially methylated region within the gene *Kcnq1* functions as an imprinted promoter and silencer. *Hum. Mol. Genet.* 12, 283–294.
- Mansmann, G., Lau, J., Balk, E., Rothberg, M., Miyachi, Y., and Bornstein, S.R. (2004). The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr. Rev.* 25, 309–340.
- Mao, B., and Niehrs, C. (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302, 179–183.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stanek, P., Walter, C., et al. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664–667.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., et al. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7, 801–809.
- Marchesa, P., Fazio, V.W., Church, J.M., and McGannon, E. (1997). Adrenal masses in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis. Colon Rectum* 40, 1023–1028.
- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349.
- Martin, G., Pilon, A., Albert, C., Valle, M., Hum, D.W., Fruchart, J.C., Najib, J., Clavey, V., and Staels, B. (1999). Comparison of expression and regulation of the high-density lipoprotein receptor SR-BI and the low-density lipoprotein receptor in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells. *Eur J Biochem* 261, 481–491.



- Matsuura, K., Deyashiki, Y., Bunai, Y., Ohya, I., and Hara, A. (1996). Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch Biochem Biophys* 328, 265–271.
- Mattos, G.E., Jacysyn, J.F., Amarante-Mendes, G.P., and Lotfi, C.F.P. (2011). Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. *Cell Tissue Res.* 345, 343–356.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 599–609.
- McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., Liu, Y., Graves, A.P., Della Pietra, A., 3rd, Diaz, E., et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108–112.
- McCart, A.E., Vickaryous, N.K., and Silver, A. (2008). Apc mice: models, modifiers and mutants. *Pathol. Res. Pract.* 204, 479–490.
- Melkonyan, H.S., Chang, W.C., Shapiro, J.P., Mahadevappa, M., Fitzpatrick, P.A., Kiefer, M.C., Tomei, L.D., and Umansky, S.R. (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13636–13641.
- Metherell, L.A., Chapple, J.P., Cooray, S., David, A., Becker, C., Rüschendorf, F., Naville, D., Begeot, M., Khoo, B., Nürnberg, P., et al. (2005). Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat. Genet.* 37, 166–170.
- Mii, Y., and Taira, M. (2009). Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Dev. Camb. Engl.* 136, 4083–4088.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4, e115.
- Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* 3, REVIEWS3001.
- Montgomery, N.D., Yee, D., Chen, A., Kalantry, S., Chamberlain, S.J., Otte, A.P., and Magnuson, T. (2005). The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. *Curr. Biol. CB* 15, 942–947.
- Moon, N.-S., and Dyson, N. (2008). E2F7 and E2F8 Keep the E2F Family in Balance. *Dev. Cell* 14, 1–3.
- Moore, A.W., Schedl, A., McInnes, L., Doyle, M., Hecksher-Sorensen, J., and Hastie, N.D. (1998). YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev* 79, 169–184.
- Moore, H.M., Gonzalez, M.E., Toy, K.A., Cimino-Mathews, A., Argani, P., and Kleer, C.G. (2013). EZH2 inhibition decreases p38 signaling and suppresses breast cancer motility and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* 138, 741–752.



- Morali, O.G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J.P., and Larue, L. (2001). IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20, 4942–4950.
- Morimoto, R., Satoh, F., Murakami, O., Suzuki, T., Abe, T., Tanemoto, M., Abe, M., Uruno, A., Ishidoya, S., Arai, Y., et al. (2008). Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. *Endocr. J.* 55, 49–55.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of  $\beta$ -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in  $\beta$ -Catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790.
- Morohaku, K., Pelton, S.H., Daugherty, D.J., Butler, W.R., Deng, W., and Selvaraj, V. (2014). Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology* 155, 89–97.
- Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., and Omura, T. (1992). A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem* 267, 17913–17919.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322–324.
- Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 276–286.
- Mulholland, D.J., Cheng, H., Reid, K., Rennie, P.S., and Nelson, C.C. (2002). The androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli. *J. Biol. Chem.* 277, 17933–17943.
- Mulholland, D.J., Read, J.T., Rennie, P.S., Cox, M.E., and Nelson, C.C. (2003). Functional localization and competition between the androgen receptor and T-cell factor for nuclear beta-catenin: a means for inhibition of the Tcf signaling axis. *Oncogene* 22, 5602–5613.
- Murayama, M., Tanaka, S., Palacino, J., Murayama, O., Honda, T., Sun, X., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Woloizin, B., and Takashima, A. (1998). Direct association of presenilin-1 with  $\beta$ -catenin. *FEBS Lett.* 433, 73–77.
- Neff, T., Sinha, A.U., Kluk, M.J., Zhu, N., Khattab, M.H., Stein, L., Xie, H., Orkin, S.H., and Armstrong, S.A. (2012). Polycomb repressive complex 2 is required for MLL-AF9 leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5028–5033.
- Neufeld, K.L., Nix, D.A., Bogerd, H., Kang, Y., Beckerle, M.C., Cullen, B.R., and White, R.L. (2000a). Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12085–12090.
- Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R., and White, R.L. (2000b). APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep.* 1, 519–523.





- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779.
- Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., Sasaki, Y., Mita, H., Nishikawa, N., Yamaguchi, K., et al. (2007). Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 26, 4699–4713.
- Novoselova, T.V., Jackson, D., Campbell, D.C., Clark, A.J.L., and Chan, L.F. (2013). Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J. Endocrinol.* 217, R1–R11.
- Ong, C.K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J.R., Allen, G.E., Ng, C.C.Y., Wong, B.H., et al. (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat. Genet.* 44, 690–693.
- Onyango, P., and Feinberg, A.P. (2011). A nucleolar protein, H19 opposite tumor suppressor (HOTS), is a tumor growth inhibitor encoded by a human imprinted H19 antisense transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16759–16764.
- Orth, D.N., and Kovacs, N.J. (1998). The adrenal cortex. In *Williams Text Book of Endocrinology*, 9th Edition, J. Wilson, D. Foster, H. Kronenberg, and P. Reed Larsen, eds. (WB Saunders company, Philadelphia), pp. 517–664.
- Paavola, L.G., Strauss, J.F., 3rd, Boyd, C.O., and Nestler, J.E. (1985). Uptake of gold- and [3H]cholesteryl linoleate-labeled human low density lipoprotein by cultured rat granulosa cells: cellular mechanisms involved in lipoprotein metabolism and their importance to steroidogenesis. *J Cell Biol* 100, 1235–1247.
- Pandit, S.K., Westendorp, B., Nantasanti, S., van Liere, E., Tooten, P.C.J., Cornelissen, P.W.A., Toussaint, M.J.M., Lamers, W.H., and de Bruin, A. (2012). E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 14, 1181–1191.
- Papadopoulos, V., Amri, H., Li, H., Boujrad, N., Vidic, B., and Garnier, M. (1997). Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. *J Biol Chem* 272, 32129–32135.
- Papadopoulos, V., Widmaier, E.P., Amri, H., Zilz, A., Li, H., Culty, M., Castello, R., Philip, G.H., Sridaran, R., and Drieu, K. (1998). In vivo studies on the role of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in steroidogenesis. *Endocr. Res.* 24, 479–487.
- Papotti, M., Libè, R., Duregon, E., Volante, M., Bertherat, J., and Tissier, F. (2011). The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. *Horm. Cancer* 2, 333–340.
- Patterson, E.E., Holloway, A.K., Weng, J., Fojo, T., and Kebebew, E. (2011). MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* 117, 1630–1639.
- Perrone, R.D., Bengel, H.H., and Alexander, E.A. (1986). Sodium retention after adrenal enucleation. *Am. J. Physiol.* 250, E1–E12.



- Pignatelli, D., Ferreira, J., Vendeira, P., Magalhaes, M.C., and Vinson, G.P. (2002). Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the rat adrenal cortex. *Endocr Res* 28, 683–691.
- Pinto, D., and Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* 306, 357–363.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709–1713.
- Plouin, P.F., Amar, L., and Chatellier, G. (2004). Trends in the prevalence of primary aldosteronism, aldosterone-producing adenomas, and surgically correctable aldosterone-dependent hypertension. *Nephrol Dial Transpl.* 19, 774–777.
- Poderoso, C., Converso, D.P., Maloberti, P., Duarte, A., Neuman, I., Galli, S., Maciel, F.C., Paz, C., Carreras, M.C., Poderoso, J.J., et al. (2008). A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS One* 3, e1443.
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14, 1837–1851.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17, 45–51.
- Prescott, J.E., Osthus, R.C., Lee, L.A., Lewis, B.C., Shim, H., Barrett, J.F., Guo, Q., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., and Dang, C.V. (2001). A novel c-Myc responsive gene, JPO1, participates in neoplastic transformation. *J. Biol. Chem.*
- Provost, P.R., Boucher, E., and Tremblay, Y. (2013). Glucocorticoid metabolism in the developing lung: adrenal-like synthesis pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138, 72–80.
- Qi, L., Sun, B., Liu, Z., Li, H., Gao, J., and Leng, X. (2012). Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression. *Cancer Sci.* 103, 828–835.
- Ragazzon, B., Lefrancois Martinez, A.M., Val, P., Sahut-Barnola, I., Tournaire, C., Chambon, C., Gachancard-Bouya, J.L., Begue, R.J., Veyssiere, G., and Martinez, A. (2006). ACTH-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147, 1805–1818.
- Ragazzon, B., Libe, R., Gaujoux, S., Assie, G., Fratticci, A., Launay, P., Clauser, E., Bertagna, X., Tissier, F., de Reynies, A., et al. (2010). Transcriptome analysis reveals that p53 and  $\beta$ -catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res* 70, 8276–8281.
- Ragazzon, B., Assie, G., and Bertherat, J. (2011). Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocr Relat Cancer* 18, R15–R27.
- Rainey, W.E. (1999). Adrenal zonation: clues from 11 $\beta$ -hydroxylase and aldosterone synthase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 151–160.



- Rainey, W.E., and Nakamura, Y. (2008). Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 108, 281–286.
- Rainey, W.E., Shay, J.W., and Mason, J.I. (1986). ACTH induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, cholesterol biosynthesis, and steroidogenesis in primary cultures of bovine adrenocortical cells. *J Biol Chem* 261, 7322–7326.
- Rao, Z.-Y., Cai, M.-Y., Yang, G.-F., He, L.-R., Mai, S.-J., Hua, W.-F., Liao, Y.-J., Deng, H.-X., Chen, Y.-C., Guan, X.-Y., et al. (2010). EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF-beta1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. *Carcinogenesis* 31, 1576–1583.
- Reincke, M., Mora, P., Beuschlein, F., Arlt, W., Chrousos, G.P., and Allolio, B. (1997). Deletion of the Adrenocorticotropin Receptor Gene in Human Adrenocortical Tumors: Implications for Tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3054–3058.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850.
- De Reynies, A., Assie, G., Rickman, D.S., Tissier, F., Groussin, L., Rene-Corail, F., Dousset, B., Bertagna, X., Clauser, E., and Bertherat, J. (2009). Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* 27, 1108–1115.
- Rigotti, A., Edelman, E.R., Seifert, P., Iqbal, S.N., DeMattos, R.B., Temel, R.E., Krieger, M., and Williams, D.L. (1996). Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J Biol Chem* 271, 33545–33549.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destrée, O., and Clevers, H. (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608–612.
- Rosol, T.J., Yarrington, J.T., Latendresse, J., and Capen, C.C. (2001). Adrenal Gland: Structure, Function, and Mechanisms of Toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 41–48.
- Roy, L., McDonald, C.A., Jiang, C., Maroni, D., Zeleznik, A.J., Wyatt, T.A., Hou, X., and Davis, J.S. (2009). Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis. *Endocrinology* 150, 5036–5045.
- Ryland, G.L., Hunter, S.M., Doyle, M.A., Rowley, S.M., Christie, M., Allan, P.E., Bowtell, D.D.L., Australian Ovarian Cancer Study Group, Goringe, K.L., and Campbell, I.G. (2013). RNF43 is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. *J. Pathol.* 229, 469–476.
- Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., and Milbrandt, J. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage



enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U A* 92, 10939–10943.

Sahut-Barnola, I., de Joussineau, C., Val, P., Lambert-Langlais, S., Damon, C., Lefrancois-Martinez, A.M., Pointud, J.C., Marceau, G., Sapin, V., Tissier, F., et al. (2010). Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. *PLoS Genet* 6, e1000980.

Al-Salameh, A., Cohen, R., and Desailoud, R. (2014). Overview of the genetic determinants of primary aldosteronism. *Appl. Clin. Genet.* 7, 67–79.

Salisbury, T.B., Binder, A.K., Grammer, J.C., and Nilson, J.H. (2007). Maximal activity of the luteinizing hormone beta-subunit gene requires beta-catenin. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 963–971.

Samani, A.A., Yakar, S., LeRoith, D., and Brodt, P. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 28, 20–47.

Sato, H., Suzuki, H., Toyota, M., Nojima, M., Maruyama, R., Sasaki, S., Takagi, H., Sogabe, Y., Sasaki, Y., Idogawa, M., et al. (2007). Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 28, 2459–2466.

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.

Sato, Y., Maekawa, S., Ishii, R., Sanada, M., Morikawa, T., Shiraishi, Y., Yoshida, K., Nagata, Y., Sato-Otsubo, A., Yoshizato, T., et al. (2014). Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome. *Science* 344, 917–920.

Sauvageau, M., and Sauvageau, G. (2010). Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7, 299–313.

Sawyer, E.J., Hanby, A.M., Poulson, R., Jeffery, R., Gillett, C.E., Ellis, I.O., Ellis, P., and Tomlinson, I.P. (2003). Beta-catenin abnormalities and associated insulin-like growth factor overexpression are important in phyllodes tumours and fibroadenomas of the breast. *J Pathol* 200, 627–632.

Schiller, M., Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2003). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-elevating agents inhibit transforming growth factor-beta-induced SMAD3/4-dependent transcription via a protein kinase A-dependent mechanism. *Oncogene* 22, 8881–8890.

Schimmer, B.P., and White, P.C. (2010). Minireview: Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease. *Mol. Endocrinol.* 24, 1322–1337.

Scholl, U.I., Nelson-Williams, C., Yue, P., Grekin, R., Wyatt, R.J., Dillon, M.J., Couch, R., Hammer, L.K., Harley, F.L., Farhi, A., et al. (2012). Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2533–2538.





- Schwarz, D., Varum, S., Zemke, M., Schöler, A., Baggiolini, A., Draganova, K., Koseki, H., Schübeler, D., and Sommer, L. (2014). Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation. *Dev. Camb. Engl.* 141, 867–877.
- Segditsas, S., and Tomlinson, I. (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531–7537.
- Semënov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kühl, M., Sokol, S., and He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol. CB* 11, 951–961.
- Seward, S., Semaan, A., Qazi, A.M., Gruzdyn, O.V., Chamala, S., Bryant, C.C., Kumar, S., Cameron, D., Sethi, S., Ali-Fehmi, R., et al. (2013). EZH2 blockade by RNA interference inhibits growth of ovarian cancer by facilitating re-expression of p21waf1/cip1 and by inhibiting mutant p53. *Cancer Lett.* 336, 53–60.
- Sharma, M., Jamieson, C., Johnson, M., Molloy, M.P., and Henderson, B.R. (2012). Specific armadillo repeat sequences facilitate  $\beta$ -catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *J. Biol. Chem.* 287, 819–831.
- Shi, B., Liang, J., Yang, X., Wang, Y., Zhao, Y., Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Li, R., et al. (2007). Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5105–5119.
- Shimizu, H., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M., and Kitajewski, J. (1997). Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 1349–1358.
- Shin, K., Lee, J., Guo, N., Kim, J., Lim, A., Qu, L., Mysorekar, I.U., and Beachy, P.A. (2011). Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* 472, 110–114.
- Simon, D.P., and Hammer, G.D. (2012). Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 2–11.
- Skelton, F.R. (1959). Adrenal regeneration and adrenal-regeneration hypertension. *Physiol. Rev.* 39, 162–182.
- Smith, T.G., Clark, S.K., Katz, D.E., Reznick, R.H., and Phillips, R.K. (2000). Adrenal masses are associated with familial adenomatous polyposis. *Colon Rectum* 43, 1739–1742.
- Song, Q., Xu, Y., Yang, C., Chen, Z., Jia, C., Chen, J., Zhang, Y., Lai, P., Fan, X., Zhou, X., et al. (2014). miR-483-5p promotes invasion and metastasis of lung adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM. *Cancer Res.* 74, 3031–3042.
- Soon, P.S., Gill, A.J., Benn, D.E., Clarkson, A., Robinson, B.G., McDonald, K.L., and Sidhu, S.B. (2009a). Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer* 16, 573–583.
- Soon, P.S.H., Libe, R., Benn, D.E., Gill, A., Shaw, J., Sywak, M.S., Groussin, L., Bertagna, X., Gicquel, C., Bertherat, J., et al. (2008). Loss of heterozygosity of 17p13, with possible



involvement of ACADVL and ALOX15B, in the pathogenesis of adrenocortical tumors. *Ann. Surg.* 247, 157–164.

Soon, P.S.H., Tacon, L.J., Gill, A.J., Bambach, C.P., Sywak, M.S., Campbell, P.R., Yeh, M.W., Wong, S.G., Clifton-Bligh, R.J., Robinson, B.G., et al. (2009b). miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 7684–7692.

Soriano, S., Kang, D.E., Fu, M., Pestell, R., Chevallier, N., Zheng, H., and Koo, E.H. (2001). Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *J. Cell Biol.* 152, 785–794.

Spät, A., and Hunyady, L. (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol. Rev.* 84, 489–539.

Su, I.-H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovsky, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* 4, 124–131.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256, 668–670.

Sun, F.L., Dean, W.L., Kelsey, G., Allen, N.D., and Reik, W. (1997). Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 389, 809–815.

Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.-W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., et al. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 36, 417–422.

Suzuki, H., Toyota, M., Carraway, H., Caraway, H., Gabrielson, E., Ohmura, T., Fujikane, T., Nishikawa, N., Sogabe, Y., Nojima, M., et al. (2008). Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br. J. Cancer* 98, 1147–1156.

Swarnakar, S., Temel, R.E., Connelly, M.A., Azhar, S., and Williams, D.L. (1999). Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem* 274, 29733–29739.

Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., Horvath, A., Stratakis, C.A., and Bourdeau, I. (2008). Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Clin Endocrinol Oxf.*

Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., and De Robertis, E.M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136–1148.

Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791–801.



- Taketo, M.M., and Edelman, W. (2009). Mouse Models of Colon Cancer. *Gastroenterology* 136, 780–798.
- Tamura, M., Kanno, Y., Chuma, S., Saito, T., and Nakatsuji, N. (2001). Pod-1/Capsulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1. *Mech Dev* 102, 135–144.
- Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K., Tan, P.B., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 21, 1050–1063.
- Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2004). Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol. Rev.* 84, 137–167.
- Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., and Dulin, N.O. (2006). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 281, 9971–9976.
- Taurin, S., Hogarth, K., Sandbo, N., Yau, D.M., and Dulin, N.O. (2007). Gbetagamma-mediated prostacyclin production and cAMP-dependent protein kinase activation by endothelin-1 promotes vascular smooth muscle cell hypertrophy through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* 282, 19518–19525.
- Terzolo, M., Angeli, A., Fassnacht, M., Daffara, F., Tauchmanova, L., Conton, P.A., Rossetto, R., Buci, L., Sperone, P., Grossrubatscher, E., et al. (2007). Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 356, 2372–2380.
- Thomas, M., Keramidas, M., Monchaux, E., and Feige, J.-J. (2004). Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology* 145, 4320–4329.
- Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (1998). Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev.* 12, 3693–3702.
- Thorvaldsen, J.L., Fedoriw, A.M., Nguyen, S., and Bartolomei, M.S. (2006). Developmental profile of H19 differentially methylated domain (DMD) deletion alleles reveals multiple roles of the DMD in regulating allelic expression and DNA methylation at the imprinted H19/Igf2 locus. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1245–1258.
- Tissier, F. (2010). Classification of adrenal cortical tumors: what limits for the pathological approach? *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 877–885.
- Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagnere, A.M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., et al. (2005). Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* 65, 7622–7627.
- Tolwinski, N.S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S., and Wieschaus, E. (2003). Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev. Cell* 4, 407–418.



- Tomaschitz, A., Pilz, S., Ritz, E., Obermayer-Pietsch, B., and Pieber, T.R. (2010). Aldosterone and arterial hypertension. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 83–93.
- Torre, C., Perret, C., and Colnot, S. (2011). Transcription dynamics in a physiological process:  $\beta$ -catenin signaling directs liver metabolic zonation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 271–278.
- Tu, L.N., Morohaku, K., Manna, P.R., Pelton, S.H., Butler, W.R., Stocco, D.M., and Selvaraj, V. (2014). Peripheral Benzodiazepine Receptor/Translocator Protein Global Knockout Mice are Viable with no Effects on Steroid Hormone Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*
- Val, P., Martinez Barbera, J.P., and Swain, A. (2007). Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development* 134, 2349–2358.
- Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* 31, 2714–2736.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624–629.
- Van Veelen, W., Le, N.H., Helvensteijn, W., Blonden, L., Theeuwes, M., Bakker, E.R.M., Franken, P.F., van Gurp, L., Meijlink, F., van der Valk, M.A., et al. (2011).  $\beta$ -catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* 60, 1204–1212.
- Verras, M., and Sun, Z. (2005). Beta-catenin is involved in insulin-like growth factor 1-mediated transactivation of the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 19, 391–398.
- Verschoor-Klootwyk, A.H., Verschoor, L., Azhar, S., and Reaven, G.M. (1982). Role of exogenous cholesterol in regulation of adrenal steroidogenesis in the rat. *J Biol Chem* 257, 7666–7671.
- Voutilainen, R., and Jääskeläinen, J. (2014). Premature adrenarche: Etiology, clinical findings, and consequences. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
- Wajchenberg, B.L., Albergaria Pereira, M.A., Medonca, B.B., Latronico, A.C., Carneiro, P.C., Ferreira Alves, V.A., Zerbini, M.C.N., Liberman, B., Gomes, G.C., and Kirschner, M.A. (2000). Adrenocortical carcinoma. *Cancer* 88, 711–736.
- Walczak, E.M., and Hammer, G.D. (2014). Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nat. Rev. Endocrinol.*
- Walczak, E.M., Kuick, R., Finco, I., Bohin, N., Hrycaj, S.M., Wellik, D.M., and Hammer, G.D. (2014). Wnt-Signaling Inhibits Adrenal Steroidogenesis by Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* me20141060.
- Wallingford, J.B., Vogeli, K.M., and Harland, R.M. (2001). Regulation of convergent extension in *Xenopus* by Wnt5a and Frizzled-8 is independent of the canonical Wnt pathway. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 225–227.





- Wang, Y., and Sul, H.S. (2006). Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5421–5435.
- Wang, H., Albadine, R., Magheli, A., Guzzo, T.J., Ball, M.W., Hinz, S., Schoenberg, M.P., Netto, G.J., and Gonzalgo, M.L. (2012). Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urol. Oncol.* *30*, 428–433.
- Wang, Y., Zhao, L., Smas, C., and Sul, H.S. (2010). Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3480–3492.
- Weber, M.M., Auernhammer, C.J., Kiess, W., and Engelhardt, D. (1997). Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol* *136*, 296–303.
- Weber, M.M., Fottner, C., Schmidt, P., Brodowski, K.M., Gittner, K., Lahm, H., Engelhardt, D., and Wolf, E. (1999). Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. *Endocrinology* *140*, 1537–1543.
- Weijts, B.G.M.W., Bakker, W.J., Cornelissen, P.W.A., Liang, K.-H., Schaftenaar, F.H., Westendorp, B., de Wolf, C.A.C.M.T., Paciejewska, M., Scheele, C.L.G.J., Kent, L., et al. (2012). E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J.* *31*, 3871–3884.
- Weiske, J., Albring, K.F., and Huber, O. (2007). The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of beta-catenin transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20344–20349.
- Werminghaus, P., Haase, M., Hornsby, P.J., Schinner, S., Schott, M., Malendowicz, L.K., Lammers, B.J., Goretzki, P.E., Müller-Mattheis, V., Markus Giessing, null, et al. (2014). Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *139*, 7–15.
- Van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., et al. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* *111*, 241–250.
- Wijnen, M., Alders, M., Zwaan, C.M., Wagner, A., and van den Heuvel-Eibrink, M.M. (2012). KCNQ1OT1 hypomethylation: a novel disguised genetic predisposition in sporadic pediatric adrenocortical tumors? *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 565–566.
- Wilhelm, D., and Englert, C. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl. *Genes Dev* *16*, 1839–1851.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* *423*, 448–452.
- Wong, W., and Scott, J.D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 959–970.



- Wong, D.L., Lesage, A., Siddall, B., and Funder, J.W. (1992). Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *6*, 3310–3315.
- Wong, H.-C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.-J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.-L., and Zheng, J. (2003). Direct Binding of the PDZ Domain of Dishevelled to a Conserved Internal Sequence in the C-Terminal Region of Frizzled. *Mol. Cell* *12*, 1251–1260.
- Wood, M.A., Acharya, A., Finco, I., Swonger, J.M., Elston, M.J., Tallquist, M.D., and Hammer, G.D. (2013). Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 4522–4532.
- Wu, G., Huang, H., Garcia Abreu, J., and He, X. (2009). Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. *PloS One* *4*, e4926.
- Wu, J., Jiao, Y., Dal Molin, M., Maitra, A., de Wilde, R.F., Wood, L.D., Eshleman, J.R., Goggins, M.G., Wolfgang, C.L., Canto, M.I., et al. (2011). Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21188–21193.
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K.S., Hilton, M.J., Williams, D.A., and Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* *133*, 340–353.
- Xie, H., Xu, J., Hsu, J.H., Nguyen, M., Fujiwara, Y., Peng, C., and Orkin, S.H. (2014). Polycomb Repressive Complex 2 Regulates Normal Hematopoietic Stem Cell Function in a Developmental-Stage-Specific Manner. *Cell Stem Cell* *14*, 68–80.
- Xu, K., Wu, Z.J., Groner, A.C., He, H.H., Cai, C., Lis, R.T., Wu, X., Stack, E.C., Loda, M., Liu, T., et al. (2012). EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science* *338*, 1465–1469.
- Yang, X., Karuturi, R.K.M., Sun, F., Aau, M., Yu, K., Shao, R., Miller, L.D., Tan, P.B.O., and Yu, Q. (2009). CDKN1C (p57KIP2) Is a Direct Target of EZH2 and Suppressed by Multiple Epigenetic Mechanisms in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* *4*, e5011.
- Yates, R., Katugampola, H., Cavlan, D., Cogger, K., Meimaridou, E., Hughes, C., Metherell, L., Guasti, L., and King, P. (2013). Adrenocortical development, maintenance, and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* *106*, 239–312.
- Yoon, S.-O., Shin, S., Liu, Y., Ballif, B.A., Woo, M.S., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2008). Ran-binding protein 3 phosphorylation links the Ras and PI3-kinase pathways to nucleocytoplasmic transport. *Mol. Cell* *29*, 362–375.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* *438*, 873–877.
- Zhang, F., White, R.L., and Neufeld, K.L. (2000). Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 12577–12582.



- Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W.-T., Lee, H.-T., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., Wang, Y., et al. (2011). FoxM1 promotes  $\beta$ -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 20, 427–442.
- Zhang, P., Liégeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A., and Elledge, S.J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151–158.
- Zhou, Y., Lan, J., Wang, W., Shi, Q., Lan, Y., Cheng, Z., and Guan, H. (2013). ZNRF3 acts as a tumour suppressor by the Wnt signalling pathway in human gastric adenocarcinoma. *J. Mol. Histol.* 44, 555–563.
- Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. (2000). Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 18), 3127–3139.
- Ziegler, M.G., Elayan, H., Milic, M., Sun, P., and Gharaibeh, M. (2012). Epinephrine and the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 14, 1–7.
- Zou, Y., Wang, F., Liu, F.-Y., Huang, M.-Z., Li, W., Yuan, X.-Q., Huang, O.-P., and He, M. (2013). RNF43 mutations are recurrent in Chinese patients with mucinous ovarian carcinoma but absent in other subtypes of ovarian cancer. *Gene* 531, 112–116.
- Zubair, M., Ishihara, S., Oka, S., Okumura, K., and Morohashi, K. (2006). Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol* 26, 4111–4121.
- Zubair, M., Parker, K.L., and Morohashi, K.I. (2008). Developmental links between the fetal and adult adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol Cell Biol* 28, 7030–7040.







Les carcinomes cortico-surrénaux (CCS) sont des tumeurs malignes rares de mauvais pronostic et pour lesquelles les options thérapeutiques efficaces sont inexistantes. Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des CCS, afin d'améliorer leur prise en charge. Les deux altérations les plus fréquentes dans les CCS sont une surexpression du facteur de croissance IGF2 et l'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Le laboratoire a mis en évidence le rôle oncogénique de la  $\beta$ -caténine à l'aide d'un modèle murin (souris  $\Delta$ Cat) présentant une activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale. Toutefois, la faible pénétrance du phénotype malin suggère la nécessité d'autres altérations pour la progression tumorale. L'objectif initial de ma thèse était de tester le pouvoir oncogénique de IGF2, seul ou en association avec l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine. Les modèles de surexpression de IGF2 dans la cortico-surrénale nous ont permis de montrer que IGF2 n'initie pas le développement de tumeurs cortico-surrénales. Dans un contexte d'activation de la  $\beta$ -caténine, la surexpression de IGF2 favorise le développement tumoral à des stades tardifs. Toutefois la formation de tumeurs malignes reste un événement rare. Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de IGF2 et l'activation de la  $\beta$ -caténine ne sont pas suffisantes dans notre modèle pour induire le développement de CCS. Une analyse rétrospective des données de transcriptome nous a permis de mettre en évidence une surexpression de l'oncogène putatif et histone méthyl-transférase EZH2, qui est associée à un mauvais pronostic. Mes travaux *in vitro* suggèrent que EZH2 est surexprimé en réponse à une surexpression des facteurs E2F et qu'il pourrait être impliqué dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose et de certaines caractéristiques tumorales des cellules cortico-surrénales humaines H295R. Des inhibiteurs pharmacologiques étant disponibles, EZH2 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des CCS.

En parallèle de ces travaux, nous avons cherché à identifier les mécanismes impliqués dans la zonation du cortex surrénal. Au cours du renouvellement tissulaire, les cellules acquièrent d'abord une identité glomérulée puis fasciculée. L'identité de la zone glomérulée repose en partie sur l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Cette voie de signalisation induit l'expression de gènes essentiels à l'identité de cette zone et inhibe l'identité fasciculée. La différenciation fasciculée des cellules doit donc reposer en partie, sur l'inhibition de cette voie de signalisation. Nous avons donc émis l'hypothèse que la signalisation PKA, activée dans la zone fasciculée par la liaison de l'ACTH à son récepteur MC2R, s'oppose à l'activité de la  $\beta$ -caténine pour permettre la différenciation fasciculée. A l'aide d'approches pharmacologiques et génétiques, nous avons pu mettre en évidence que l'activation de la PKA inhibe la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le cortex surrénal et que ceci est à l'origine d'une perte de la zone glomérulée au profit d'une expansion de la fasciculée. L'effet de la PKA sur la voie Wnt résulte au moins en partie de l'inhibition de l'expression de Wnt4 en réponse à l'activation de la PKA. En effet une diminution d'expression de Wnt4 est observée en réponse à l'activation de la PKA dans la cortico-surrénale et l'inactivation de Wnt4 spécifiquement dans le cortex induit un phénotype proche de celui observé lors de l'activation de la PKA. Au delà des mécanismes moléculaires de la zonation, nous avons également montré que l'effet inhibiteur de la PKA sur la signalisation Wnt était capable de s'opposer aux effets oncogéniques de la  $\beta$ -caténine dans la cortico-surrénale. Ces observations pourraient s'avérer pertinentes, la voie de signalisation ACTH/PKA étant inhibée dans les CCS.

**Mots clés :** carcinome cortico-surrénal, voie Wnt/ $\beta$ -caténine, IGF2, EZH2, PKA, zonation du cortex surrénal.